

MONTPELLIER SUPAGRO

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

Discipline : Génie des procédés

École doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

Présentée et soutenue publiquement

Par

Mady CISSE

Le 17 décembre 2010

COUPLAGE DE PROCÉDÉS MEMBRANAIRES POUR LA PRODUCTION D'EXTRAITS ANTHOCYANIQUES : APPLICATION À *HIBISCUS SABDARIFFA*

JURY

Mme Marie-Laure LAMELOISE	Professeur, AgroParisTech Massy	Rapporteur
M. Pascal DHULSTER	Professeur, Université Lille 1	Rapporteur
M. Marie-Pierre BELLEVILLE	Maître de conférences, Univ. Montpellier II	Examineur
M. Oumar SOCK	Professeur, Université Ziguinchor, Sénégal	Examineur
M. Max REYNES	Chercheur CIRAD, Montpellier	Examineur
M. manuel DORNIER	Professeur, Montpellier SupAgro	Dir. de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche n'est pas l'apanage d'un seul homme, bien qu'il serve maintenant à n'en couronner qu'un seul. De nombreuses personnes y ont participé apportant leur pierre à ce que je considère comme une œuvre collective. C'est la raison pour laquelle, au bout de trois ans, malgré mes occupations professionnelles, j'ai pu mener à bien, je l'espère, ce travail de recherche dans des conditions plus ou moins favorables selon le lieu de travail.

J'adresse mes chaleureux remerciements et toute ma grande reconnaissance à Monsieur Max Reynes, Directeur de l'UMR Qualisud du CIRAD pour m'avoir accueilli au sein de sa structure. M. Reynes m'a toujours soutenu pour que je puisse mener ce travail de recherche dans les meilleures conditions possibles. Ces remerciements s'adressent également aux Professeurs Abdou Salam Sall, El Hadji Habib Ngom et Mamadou Adj.

J'exprime toute ma reconnaissance à Manuel Dornier, Professeur à Montpellier SUPAGRO pour avoir assuré la direction de cette thèse. Depuis 10 ans il ne cesse de me former pas à pas, de me transmettre tout son savoir. Il m'a conseillé tout au long de ces années de recherche avec beaucoup de rigueur, de responsabilité, et de patience. J'ai pu compter sur ses conseils, son encouragement. Son éternelle disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée ont été mes plus grands atouts. Je lui exprime ma sincère gratitude. Il a supervisé au quotidien ce travail. Ses encouragements fréquents et son engagement toujours enthousiaste ont été une grande source d'inspiration, de motivation et d'enrichissement. M. Dornier sachez que c'est un honneur de travailler avec vous et je suis fier d'être officiellement votre premier Doctorant.

Je tiens à remercier M. Oumar SOCK, Recteur de l'Université de Ziguinchor, pour son encadrement. Il m'a conseillé tout au long de ces années de recherche avec beaucoup de rigueur, de responsabilité, et de patience. Je lui exprime ma sincère gratitude. Ses sincères remerciements s'adressent également aux Professeurs Mama SAKHO et Codou MAR GUEYE. Ces trois constituent le cœur de l'équipe ESP.

Je remercie également M. Fabrice VAILLANT, HDR et chercheur du CIRAD basé au CITA au Costa Rica. Malgré la distance qui nous séparait, j'ai toujours pu compter sur ses conseils pertinents. Sa disponibilité et sa forte implication dans l'exploitation des résultats et la rédaction des publications ont été d'un apport inestimable. Il a été l'un des initiateurs de cette thèse. Ses remerciements s'adressent également à M. Dominique PALLET, Chercheur au CIRAD et à M. Philippe BOHUON, Maître de Conférences à Montpellier SupAgro.

Je tiens à remercier Mme Marie-Laure LAMELOISE et Mr Pascal DHULSTER d'avoir accepté de rapporter cette thèse. Je remercie également Mme Marie-Pierre BELLEVILLE pour sa participation à son examen.

Mes vifs remerciements à l'endroit du personnel technique de l'UMR en particulier à FEU Daniel Dijoux, Pascaline Alter, Sonia Bouquet, Julien Ricci, Gilles Morel Jean-Paul Fleuriot, Pierre Pruvost et Denis Gounelle pour leur appui technique sans faille. Vous étiez un des maillons essentiels de ce travail.

J'adresse également toute ma reconnaissance aux différentes assistantes de l'UMR Qualisud en particulier Nadine LOPEZ, Jocelyne RENDA, Marie-Pierre OBEDE.

Je remercie vivement toute l'équipe de l'UMR Qualisud du CIRAD pour leur disponibilité, leur assistance technique, pour l'ambiance sympathique qui règne au sein du groupe. Cette équipe donne une image positive de l'entente entre les populations du monde avec ces jeunes chercheurs multinationaux.

Je tiens à remercier tout mes frères, amis et collègues doctorants en particulier Doudjo SORO, Ibrahima CISSE, Mohamed CISSE, Fernando PINTO DE ABREU, Joseph BASSAMA Je garderai d'eux le souvenir de discussions très enrichissantes et amusantes.

Je tiens à remercier le département Génie Chimique et Biologie Appliquée de l'ESP. Chers Professeurs, chers collègues enseignants, chers collègues techniques et administratifs, chers étudiants, je vous dis DIEURE DIEUF.

Je désire également associer à ce travail de recherche, les étudiants stagiaires qui ont largement contribué à sa réalisation. Votre apport a été de qualité et j'ai beaucoup appris avec vous.

Finalement, lors de la réalisation de cette thèse entre la France et le Sénégal j'ai eu l'opportunité de faire la connaissance de nombreuses personnes dont certaines demeurent des amis.

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

PUBLICATIONS

Cisse M, Dornier M., Sakho M., Diop C.M., ReyneS M., Sock O (**2009**). La production de bissap (*Hibiscus sabdariffa*) au Sénégal *Fruits*, vol. 64, p. 111–124

Cisse M, Dornier M., Sakho M., Ndiaye A., Reynes M., Sock O(**2009**) Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations *Fruits*, vol. 64, (3) p. 179–193

Cisse M., Vaillant F., Acosta O., Dhuique-Mayer C., and DornierR M (**2009**). Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 6285–6291

Cisse M., Vaillant F., Kane A., Ndiaye O., Dornier M. Anthocyanins and Color Degradation Kinetics of Roselle Extracts During Storage. *Soumis au Journal of Agricultural and Food Chemistry*

Cisse M., Bohuon P. , Kane C., Sakho M. , Sock O. ,Dornier M aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: experimental kinetics and modeling. *Soumis au Journal of Food Engineering*

Cisse M., Vaillant F., Soro D., Reynes M., Dornier M. Interest of crossflow microfiltration for the cold stabilization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* l.) extract. *Soumis au Journal of Food Engineering*

Cisse M., Dornier M., Vaillant F selection of ultrafiltration and nanofiltration membranes suitable for the concentration of anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* l.). *Soumis au Journal Membrane Science*

Cisse M., Vaillant F., Bouquet S. Pallet D., Lutin Florence., Dornier M. Athermal concentration by osmotic evaporation of roselle extract, apple and grape juice and impact on quality. *Soumis au Journal of Food Engineering*

CONGRÈS

Cisse M., Sakho M., Ayessou N. Diop C.M., Diawara B., Dornier M. Production d'extrait anthocyanique d'*Hibiscus sabdariffa* par évaporation osmotique. Journées scientifiques du réseau de chercheurs « Génie des Procédés Appliqué à l'Agroalimentaire » 17 / 18 juin 2010, Québec, Canada

Cisse M., Sakho M., Diop C.M., Pallet D, Dornier M., SOCK O. (**2009**). Purification et concentration d'un extrait d'*hibiscus sabdariffa* riche en anthocyanes par des techniques membranaires 12^{èmes} Journées Annuelles du 10 au 15 août **2009** Société Ouest-Africaine de Chimie (SOACHIM) Yamoussoukro, Côte d'Ivoire

Cisse M, Dornier M, Pallet D., Reynes M. (**2009**) Concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* l.) extract rich in anthocyanins by nanofiltration EFFoST Conference – New Challenges in Food Preservation 11th – 13th November **2009** Budapest, Hongrie.

A Feu El Hadji Mamadou Ady NIASS,

A mon Père El Hadji Daouda CISSE,

A ma mère Adja Adama DIOUF CISSE,

A mes Frères et Soeurs CISSE,

A ma chère épouse Ndèye Astou Mbacké SECK CISSE ,

A mon cher fils papa Daouda et mamam Adam,

Votre Serviteur vous rend hommage.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1-La production du bissap (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) au Sénégal.....	6
2-Le Bissap (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) : composition et principales utilisations.....	21
3-Extraction solide-liquide de molécules actives	37
3-1- Définition.....	37
3-2- Mécanismes de l'extraction solide-liquide	39
3-3- Cinétiques de l'extraction solide-liquide : cas d'une opération en batch	39
3-4- Facteurs influençant les performances de l'extraction solide-liquide	41
3-5- Performances de l'extraction solide-liquide	43
5-2- Rendement	43
5-3- Sélectivité	44
4-Les procédés baromembranaires.....	45
4-1- Généralités sur les procédés baromembranaires.....	47
4-2- Microfiltration tangentielle des jus de fruits.....	56
4-3- Ultrafiltration	62
4-4- Nanofiltration.....	64
5-L'évaporation osmotique.....	72
5-1- Principes fondamentaux	72
5-2- Variables du procédé	73
5-3- Intérêts et limites du procédé.....	79
5-4- Applications.....	80

MATERIEL ET METHODES.....	84
1- Matériel végétal et préparation des extraits.....	85
2- Caractérisation des calices, extraits et concentrés	85
2-1- Dosage de la vitamine C par chromatographie liquide haute performance (CLHP)	85
2-2- Dosage des polyphénols totaux	87
2-3- Dosage des anthocyanes totaux	87
2-4- Détermination du pouvoir antioxydant par la méthode ORAC	88
2-5- Dosage des acides organiques	89
2-6- Dosage des sucres.....	89
2-7- Analyses des éléments minéraux des calices d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	89
2-8- Détermination de la teneur en azote total	90
2-9- Détermination du matériel insoluble dans l'alcool.....	91
2-10- Analyses des composés d'arôme par SPME.....	91
2-11- Analyses microbiologiques.....	93
2-12- Analyses sensorielles	94
3- Optimisation de l'extraction des anthocyanes d'<i>Hibiscus sabdariffa</i>.....	95
3-1- Dispositif expérimental.....	95
3-2- Exploitation des résultats.....	95
3-3- Modélisation de l'extraction aqueuse des anthocyanes d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	96
4- Dégradation thermique et stabilité des anthocyanes d'<i>Hibiscus sabdariffa</i>	98
4-1- Dispositif expérimental.....	98
4-2- Exploitation des résultats.....	100
5- Conduite des essais en microfiltration tangentielle.....	102
5-1- Description des équipements	102
5-2- Modes de conduite des essais	104
5-3- Conduite de l'essai réalisé pour l'étude de la stabilité de l'extrait microfiltré.....	105
6- Conduite des essais d'ultrafiltration et de nanofiltration	105
6-1-Description du pilote	105

6-2- Caractéristiques des membranes.....	107
6-3- Exploitation des résultats.....	107
7- Conduite de l'évaporation osmotique	109
7-1- Descriptif du pilote	109
7-2- Mise en régime et conduite du procédé	110
7-3- Mesure et régulation des paramètres du procédé.....	111
RESULTATS ET DISCUSSION	113
1- Caractérisation et stabilité des extraits anthocyaniques	115
1-1- Caractérisation des calices d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	115
1-2- Etude de la dégradation thermique des anthocyanes d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	117
1-3- Etude de la stabilité des anthocyanes d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	127
2- Optimisation de l'extraction aqueuse des anthocyanes d'<i>Hibiscus sabdariffa</i>	154
3- Microfiltration de l'extrait aqueux d'<i>Hibiscus sabdariffa</i>.....	169
4- Pré-concentration par ultrafiltration et nanofiltration	187
5- Concentration par évaporation osmotique	209
6- Couplage des opérations unitaires.....	229
6-1 Les différents couplages	229
6-2 Méthodes d'évaluation des coûts.....	234
6-3- Résultats.....	236
Conclusion.....	242
CONCLUSION.....	245
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	249

INTRODUCTION

Au Sénégal, les fruits, légumes et autres végétaux sont généralement consommés frais. Il en résulte d'énormes pertes essentiellement causées par l'absence de technologies de conservation et de transformation appropriées. Les pertes post-récolte sont alors toujours très importantes et grèvent fortement la rentabilité de la production.

De plus, avec le déclin des cultures traditionnelles comme le mil, le sorgho, le maïs et surtout l'arachide, les paysans sénégalais sont confrontés à d'énormes problèmes financiers. La recherche d'une ou de plusieurs cultures de substitution a amené les paysans à s'orienter de plus en plus vers des solutions alternatives telles la culture de l'*Hibiscus sabdariffa* L. et d'autres.

Introduit à partir du 19^{ème} siècle, *Hibiscus sabdariffa* encore appelé bissap au Sénégal, est aujourd'hui cultivé sur l'ensemble du territoire national, principalement dans le bassin arachidier, au centre du pays, comprenant les régions de Djourbel, Kaolack, Fatick et Thiès. Ainsi, avec des superficies cultivées moyennes comprises entre 5000 et 6500 ha pour une production nationale annuelle de 1200 à 3000 t et une estimation de 30000 à 40000 producteurs, *Hibiscus sabdariffa* occupe actuellement une place importante, au Sénégal. Le bissap fait par ailleurs partie des sept filières inscrites dans la cadre de la Stratégie de Croissance Accélérée (SCA) du gouvernement sénégalais, appuyée par l'USAID à travers le projet *Support for Accelerated Growth and Increased Competitiveness* (SAGIC) installé au Sénégal depuis 2006.

Les calices rouges d'*Hibiscus sabdariffa* sont utilisés dans l'alimentation humaine pour la production de confiture, gelée et surtout de boissons rafraichissantes présentant une couleur rouge attractive et un goût plus ou moins acidulé selon les variétés. La couleur rouge est due à la richesse des calices en anthocyanes qui présenteraient plusieurs intérêts nutritionnels et médicaux. Les anthocyanes présents dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa* pourraient être utilisés pour l'élaboration de boissons et comme colorant naturel que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans d'autres secteurs tels que les industries pharmaco-cosmétiques.

Depuis quelques années, un réel engouement pour les colorants alimentaires d'origine naturelle est catalysé par les récentes interdictions de colorants artificiels pour des raisons toxicologiques (1). Avec un chiffre d'affaire de 940 million USD, le marché des colorants naturels augmente de 4 à 6 % par an comparé à celui des colorants artificiels (400 millions USD), qui lui n'augmente que de 2 à 3 % par an (1, 2). Le succès commercial des colorants alimentaires naturels répond aux tendances actuelles des consommateurs qui demandent un retour à l'aliment naturel. Les colorants d'origine naturelle répondent à une demande croissante des consommateurs qui craignent l'effet sur leur santé des colorants artificiels.

Pour le bissap, l'accès à ce marché accroîtrait d'une manière significative les revenus des paysans et contribuerait à l'équilibre d'une balance commerciale hautement déficitaire. Cet accès passe nécessairement par la production d'extrait anthocyanique stable au cours du temps avec une qualité nutritionnelle et organoleptique optimale. La production devra en outre être réalisée localement grâce à des technologies remplissant plusieurs exigences :

- capacité de production modulaire. Il est rare qu'une zone de production soit complètement développée. Il existe des foyers de production de calices d'*Hibiscus sabdariffa* ayant la capacité de s'étendre en fonction de la demande ;
- technologie économiquement viable à plusieurs échelles de production (petite, moyenne et grande). Le coût de transformation par les technologies classiques est généralement très sensible aux économies d'échelle ;
- investissement en rapport avec la capacité de production. Ce n'est pas le cas pour les technologies classiques ;
- technologie permettant la stabilisation microbiologique du produit et plus respectueuse de la qualité organoleptique et nutritionnelle. Cet aspect devient un argument commercial de plus en plus exigé par le marché ;
- technologies permettant l'élaboration de produit intermédiaire satisfaisant les critères de qualité requis par les industries de seconde transformation.

Les technologies membranaires répondent à la plupart de ces exigences. Ainsi, nous avons choisi de centrer nos investigations sur l'application de la microfiltration tangentielle, de l'ultrafiltration, de la nanofiltration et de l'évaporation osmotique sur l'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa*.

La microfiltration tangentielle permet d'obtenir des jus clarifiés à partir de jus pulpeux. Ces jus clarifiés peuvent être utilisés dans différents secteurs tels les boissons rafraîchissantes sans alcools, les cocktails, les liqueurs de fruits, la confiserie, la pâtisserie et les cosmétiques. De plus, elle est utilisée de plus en plus comme un procédé de stabilisation à froid des jus de fruits tout en préservant les qualités nutritionnelle et organoleptique du produit.

L'ultrafiltration (UF) est très utilisée dans l'industrie laitière d'une part, pour concentrer le lait destiné à la fabrication du fromage, d'autre part pour traiter le lactosérum. Cette technologie est également utilisée dans l'industrie des jus de fruits pour la concentration de solutés d'intérêt nutritionnel (polyphénols) à moindre coût énergétique ou l'élimination de composés plus ou moins nocifs (métaux lourds, pesticides, etc.).

La nanofiltration (NF) est une technique membranaire de séparation relativement récente dont le champ d'application se situe entre ceux de l'osmose inverse et de l'ultrafiltration. La nanofiltration, technologie innovante fait l'objet de nombreuses applications dans presque tous les secteurs d'activités. Cependant, les applications en agroalimentaire sont très limitées et se retrouvent principalement dans le traitement de l'eau (3) et dans l'industrie laitière (4). Les applications sur les jus de fruits sont peu nombreuses malgré la faible consommation énergétique et la simplicité de mise en œuvre du procédé.

Dans l'industrie des jus de fruits, l'opération de concentration revêt une importance particulière. La saisonnalité de la production des fruits et l'éloignement fréquent des zones de production et de consommation imposent de longues périodes de stockage et de transport des produits finis. L'élimination d'une partie de l'eau contenue dans les jus de fruits permet de diminuer leur volume et ainsi de limiter significativement les coûts liés au stockage et au transport. Associé à cet intérêt économique, la concentration des jus de fruits contribue également à améliorer leur stabilité en diminuant notamment l'activité de l'eau et le pH (5). Dans ce domaine, les producteurs industriels de jus de fruits sont à la recherche de procédés de transformation qui respectent au mieux les qualités originelles des fruits. Ainsi plusieurs études ont permis de montrer que l'évaporation osmotique permet de concentrer les jus de fruits jusqu'à des teneurs en extrait sec soluble (ESS) de l'ordre de 600 à 700 g.kg⁻¹ tout en préservant les qualités nutritionnelles et organoleptiques du concentré obtenu (6, 7).

Dans ce contexte, notre étude a pour objectif, d'intégrer l'ensemble de ces procédés pour développer une stratégie permettant la production d'extraits anthocyaniques à partir des calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Le premier chapitre de ce document propose tout d'abord une synthèse bibliographique sur la matière première, *Hibiscus sabdariffa*, en la resituant dans son cadre sénégalais. Il regroupe ensuite les principaux éléments qui caractérisent les opérations unitaires abordées dans ce travail : extraction solide-liquide, micro-, ultra- et nano-filtration et enfin, évaporation osmotique. Le second chapitre sera classiquement consacré aux matériels et aux méthodes. Y seront décrits les différentes variétés d'*Hibiscus sabdariffa* utilisées, les méthodes d'analyses quantitatives mobilisées et les dispositifs expérimentaux mis en œuvre. Enfin, le dernier chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus, leur exploitation et leur discussion. La première partie de ce chapitre présente la caractérisation de la matière première et l'étude de la stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*. Chacune des opérations unitaires choisies est ensuite successivement étudiée. Enfin, la dernière partie propose une réflexion sur l'intégration de l'ensemble de ces opérations unitaires. Elle compare divers itinéraires technologiques en cherchant à dégager la meilleure stratégie de couplage.

La rédaction de ce document s'appuie, lorsque cela est possible, sur les articles scientifiques issus de ce travail (déjà publiés ou en cours d'évaluation). Dans ce cas, l'article présenté est précédé d'un résumé. Celui-ci reprend quelques éléments du contexte et les principaux résultats obtenus. Il doit également permettre de faire le lien avec les autres parties du mémoire.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Publication n°1

1-La production du bissap (*Hibiscus sabdariffa*) au Sénégal

Fruits, (2009), 64, 111–124

Article de synthèse

La production du bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au SénégalMady CISSE^{1,2}, Manuel DORNIER^{1*}, Mama SAKHO², Codou MAR DIOP², Max REYNES¹, Oumar SOCK²

¹ UMR 95 Qualisud,
Montpellier SupAgro, CIRAD,
TA B-95/16,
73 rue Jean-François Breton,
F-34398 Montpellier Cedex 5,
France
dornier@cirad.fr

² ESP, Dép. GCBA, BP 5085,
Dakar Fann, Sénégal

Bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) production in Senegal.

Abstract — Production area. Introduced in the XIXth century, *H. sabdariffa* L. is grown throughout the territory of Senegal, particularly in the Kaolack, Djourbel, Thiès, Saint-Louis and Louga regions. **Agricultural practises.** In these areas, cultivated surfaces vary between (0.25 and 5) ha and are managed for the most part by women who are grouping together more and more in associations or economic interest groups. It is grown in the winter period in a cycle of (120 to 165) days, depending on traditional practises, and usually without fertilizer. The harvest and post-harvest treatments are carried out manually, while drying is carried out in the sun and often directly on the floor. **Varieties.** Two types of *H. sabdariffa* are found: the green and red types. The red type includes mainly four varieties (Vimto, Koor, CLT 92 and Thai) with different characteristics. **Transformation.** The main processing activities of the *H. sabdariffa* calyx are crushing, and the production of drink and concentrate, jam and instant powder. The manufacture of beverages, the main method of transformation, carried out under the direction of women's groups, has remained virtually artisanal. **Markets.** With a support program of the Senegalese state, the increase in the cultivated areas and the number of actors, *H. sabdariffa* occupies an important place in the marketing of agricultural products in Senegal. The export of dried calyx of *H. sabdariffa* to Europe and the United States at prices between (1,000 and 2,500) \$US·t⁻¹ is increasing year by year.

Senegal / *Hibiscus sabdariffa* / vegetable growing / interest groups / processing / markets

La production du bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au Sénégal.

Résumé — Zones de production. Introduit au XIX^e siècle, le bissap (*H. sabdariffa* L.) est cultivé sur l'ensemble du territoire sénégalais et plus particulièrement dans les régions de Kaolack, Djourbel, Thiès, Saint-Louis et Louga. **Pratiques agricoles.** Dans ces régions, les superficies utilisées varient entre (0,25 et 5) ha et sont gérées pour la majeure partie par des femmes qui se regroupent de plus en plus en association ou en groupement d'intérêt économique. La plante est cultivée en période d'hivernage sur un cycle de (120 à 165) j selon des pratiques traditionnelles, généralement sans apport d'engrais. La récolte et les traitements post-récoltes sont effectués manuellement et le séchage est réalisé au soleil, souvent à même le sol. **Variétés.** Deux types d'*H. sabdariffa* sont rencontrés : le type vert et le type rouge qui comprend essentiellement quatre variétés (Vimto, Koor, CLT 92 et Thai) aux caractéristiques différentes. **Transformation.** Les principales activités de transformation des calices d'*H. sabdariffa* sont le concassage, la production de boisson, de concentré, de confiture et de poudre instantanée. La fabrication de boisson, principale voie de transformation, effectuée sous la direction de groupements féminins est restée quasiment artisanale. **Marchés.** Bénéficiant d'un programme d'appui de l'État sénégalais, l'augmentation des superficies cultivées et du nombre d'acteurs économiques impliqués dans la filière de production du bissap confèrent aujourd'hui à cette culture une place importante dans la commercialisation des produits agricoles au Sénégal. L'exportation des calices secs d'*H. sabdariffa* vers l'Europe et les États-Unis à des prix situés entre (1 000 et 2 500) \$US·t⁻¹ augmente d'année en année.

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 4 juin 2008
Accepté le 24 août 2008

Fruits, 2009, vol. 64, p. 111–124
© 2009 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits/2009006
www.fruits-journal.org

RESUMEN ESPAÑOL, p. 124

Sénégal / *Hibiscus sabdariffa* / culture maraîchère / groupe d'intérêt / traitement / marché

1. Introduction

Hibiscus sabdariffa L. de la famille des malvacées est connu sous différentes appellations : oseille de Guinée, bissap au Sénégal, karkadé en Afrique du Nord, roselle, sorrel ou sour tea en anglais, ngai-ngai en Afrique centrale, groseille de Noël aux Antilles, flores de Jamaica en Amérique centrale [1–7]. C'est une plante herbacée, annuelle, à feuilles alternes. Les fleurs sont axillaires solitaires, formant de faux épis lâches et hermaphrodites. L'espèce est autogame.

Au Sénégal, le bissap a été introduit à partir du XIX^e siècle [8]. Il y est aujourd'hui cultivé sur l'ensemble du territoire national, principalement dans le bassin arachidier, au centre du pays, comprenant les régions de Djourbel, Kaolack, Fatick et Thiès.

La culture de bissap se présente actuellement comme une source de revenus non négligeable pour les agriculteurs sénégalais [9]. Cette culture représente une autre option de production de rente dans une région qui souffre du déclin de la filière de l'arachide. De nombreux producteurs cultivent le bissap pour leur propre consommation et les surplus sont commercialisés aussi bien sur le marché local que vers ceux d'exportation.

Dans notre article, nous avons cherché à décrire les principaux éléments caractéristiques de la filière bissap, de sa production jusqu'à sa commercialisation. L'objectif de ce travail a été d'apporter quelques éléments d'analyse sur les différents segments et acteurs de cette filière. Il traite tour à tour de la culture et des traitements post-récoltes de la plante, des producteurs, des commerçants et des circuits de distribution et de commercialisation, en passant par les opérations et les acteurs de sa transformation. Seules les variétés d'*H. sabdariffa* cultivées pour la production de calices rouges sont considérées dans notre étude.

Nous nous sommes appuyés tout d'abord sur différents documents produits par des organismes travaillant sur cette filière : l'Ins-

titut de Technologie Alimentaire (ITA) de Dakar, l'Institut Sénégalais de Recherches Agronomique (ISRA), le Centre de Développement Horticole (CDH) de Dakar de l'ISRA, la Direction de Protection des Végétaux (DPV) du ministère de l'Agriculture du Sénégal, le groupement d'intérêt économique Valorisation des Produits Végétaux (VAPROVET) et l'antenne sénégalaise de l'*Agribusiness in Sustainable Natural African Plan Products* (ASNAPP). Par ailleurs, une série d'enquêtes a été réalisée auprès des acteurs de la filière (producteurs, commerçants, consommateurs, etc.) et des visites de terrains ont été menées durant les campagnes agricoles de 2005 à 2007.

2. Méthodes d'enquêtes

Les enquêtes menées de 2005 à 2007 ont été basées sur des discussions ouvertes avec différents acteurs de la filière. Quinze producteurs localisés dans les régions de Kaolack, Djourbel, Thiès et Louga ont ainsi été interrogés sur les lieux de production. Dans ce cas, la discussion générale a englobé tous les aspects de leurs activités. Des questions précises ont systématiquement été abordées portant, par exemple, sur la période de semence, de récolte, le temps de travail consacré à la culture d'*H. sabdariffa*, l'utilisation d'engrais, ainsi que sur la nature des techniques culturales, l'utilisation et la destinée des calices, l'identification des clients et la définition des prix de vente, etc.

Quinze grossistes et 30 détaillants présents sur des marchés urbains ont été interrogés. Les marchés sélectionnés pour ces entretiens ont été ceux de Grand Yoff, de Castor et du marché de la gare ferroviaire à Dakar ; de Thiaroye et de Sandicat de Pikine dans la banlieue dakaroise ; du marché central de Kaolack et de celui de Touba à Djourbel dans les régions. Des vendeuses de bissap installées sur les bords de routes ont également été interrogées à l'occasion des déplacements inter-régionaux (dix vendeuses sur l'axe routier Dakar-Kaolack, huit sur l'axe Dakar-Touba). Lors des visites dans les marchés, vingt-cinq clientes qui venaient acheter des calices ont été interviewées. Enfin, des consommateurs ont été rencontrés dans les points de vente de la boisson,

¹ <http://www.fintrac.com>, Fintrac, Étude de marché sur l'*Hibiscus sabdariffa*, 1999, consulté en 2007.

H. sabdariffa au Sénégal

notamment dans les marchés, les écoles, les lycées et à l'université Cheikh Anta Diop de Dakar.

3. Zones de production

Au Sénégal, les régions de Kaolack, Djourbel, Thiès, Louga et Saint-Louis correspondent aux zones où la culture d'*H. sabdariffa* est une activité ancienne, généralement menée en mode de production extensif (figure 1).

Dans la zone Nord (Louga et Saint-Louis), le bissap est cultivé principalement en lignes, sur les diguettes de délimitation de parcelles de riz dans le Walo, région proche de Saint-Louis, et en association avec les cultures de mil, de maïs ou d'arachide dans le Diéri. Le Diéri est un terme géographique d'origine toucouleur qui désigne les terres non inondables de la vallée du fleuve Sénégal. Celles-ci se situent dans la région de Saint-Louis.

Dans la zone centre (Kaolack, Djourbel), le bissap se cultive principalement en association avec l'arachide ou le mil. Cependant, les cas de monoculture y sont de plus en plus fréquents du fait des opportunités d'exportations de calices secs d'*H. sabdariffa*. Cette augmentation de la monoculture de bissap est favorisée par l'appui d'organismes non gouvernementaux tels que l'ASNAPP (*Agribusiness in Sustainable Natural African Plant Products*) au Sénégal, VAPROVET (association constituée de chercheurs de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar au Sénégal) ou la fondation « Éducation-Santé » qui fournissent aux producteurs des semences pures. Ces organismes jouent de plus en plus un rôle de centrale d'achat pour l'exportation des calices.

La culture du bissap est moins développée dans les zones Est et Sud (régions de Tambacounda, Kolda). Elle y est presque exclusivement réalisée en association avec le mil, l'arachide ou le maïs.

4. Variétés

Au Sénégal, deux types d'*H. sabdariffa* sont utilisés : le type vert et le type rouge. Le type

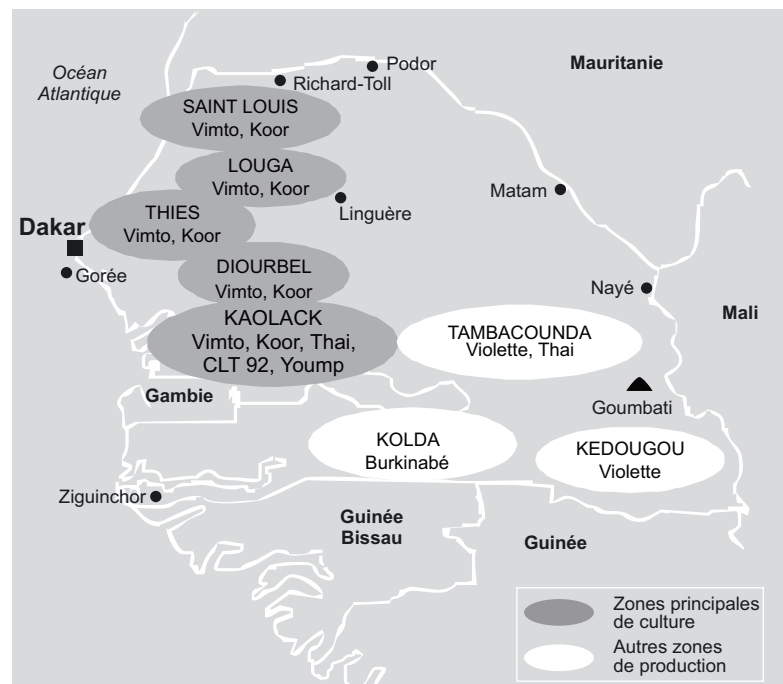


Figure 1. Aire approximative de la production d'*Hibiscus sabdariffa* au Sénégal et principales variétés cultivées.

vert nommé « bissap vert » est principalement utilisé comme condiment dans les sauces (calices) ou comme légume-feuilles dans l'alimentation des populations [10, 11]. Le type rouge est utilisé essentiellement pour la préparation de boissons [12] ; il regroupe quatre variétés : « Koor », « Thaïlandaise », « CLT 92 » et « Vimto » (figure 2). D'autres variétés rouges (« Bambara », « Burkina », « Violette » ou ordinaire) sont également cultivées.

La variété « Vimto » donne des fleurs de gros diamètre (4,5 cm) et de grande longueur (8,5 cm) avec des sépales rouge vif ouverts vers l'extérieur. Les teneurs en anthocyanes des calices secs sont de (10 à 15) g·kg⁻¹ et celles en vitamine C sont de 0,5 g·kg⁻¹. Les calices sont de couleur rouge sombre et peu acidulés. Le rendement en calices séchés peut atteindre dans les conditions optimales 500 kg·ha⁻¹ [9]. La variété est présente dans toutes les zones agro-écologiques du Sénégal (tableau D). Cette variété, originaire du Soudan, bénéficie d'une excellente réputation sur les marchés internationaux.

La variété « Koor » se distingue par un calice conique de petite taille (diamètre

M. Cisse *et al.*

Figure 2.
Calices séchés de quatre variétés d'*Hibiscus sabdariffa* cultivées au Sénégal.

3,5 cm et longueur 4,5 cm). Elle est moins riche en extrait sec et en anthocyanes ($3-7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) mais présenterait des teneurs élevées en acides organiques. Ses calices sont plus acides que ceux de la variété « Vimto ». Son rendement en calices séchés est compris entre $(250 \text{ et } 300) \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (tableau I). Elle est cultivée dans toutes les zones agro-écologiques du pays notamment dans le bassin arachidier où elle y est connue depuis longtemps. La production de cette variété locale est moins développée que celle de la variété « Vimto ». Cependant, lors des entretiens avec les acteurs de la filière, notamment avec les exportateurs, certains ont clairement indiqué que la variété Koor était demandée en raison de son acidité élevée. Elle est facile à commercialiser du fait de sa relative rareté. Selon les témoignages recueillis, cette variété est utilisée en mélange avec la variété « Vimto », pour rehausser le goût acidulé lors de la transformation des calices en boisson et confiture.

La variété « Thaïlandaise » appelée « Thai », se distingue de toutes celles précitées par la grande taille de la plante (2 m de haut). Cette variété a été sélectionnée en Thaïlande pour sa richesse en fibres. Ses calices rouges

Tableau I.

Caractéristiques des variétés d'*Hibiscus sabdariffa* de type rouge, cultivées au Sénégal.

Variétés	Origine	Zones de culture	Morphologie	Dimensions calices (longueur/diamètre) (cm)	Cycle végétatif (jours)	Couleur calices	Rendement ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ calices secs)
Vimto	Soudan	Toutes zones	Sépales ouverts vers l'extérieur, droits, légèrement recourbés au sommet	8,5 / 4,5	140	Rouge sombre	500
Koor	Sénégal	Toutes zones avec prédominance dans la région de Kaolack	Calice de forme conique	4,5 / 3,5	120	Rouge clair	250–300
Thai	Thaïlande	Kaolack, Tambacounda	Arbre de grande taille (2 m), riches en fibres	4,5 / 3,5	165	Rouge clair	250–300
CLT 92	Mexique	Kaolack	Arbre de taille moyenne	4,5 / 3,5	130	Rouge foncé ou bleu violacé	250–300
Burkinabé	Burkina Faso	Kolda, Kaolack	Calice de forme conique	4,5 / 3,5	120	Rouge	250
Yoump	Sénégal	Kaolack	Calice de forme conique	4,5 / 3,0	140	Rouge	250
Violette	Sénégal	Kédougou, Tambacounda	Hybride naturel entre les variétés Koor et Yoump	4,5 / 3,0	140	Violet	250

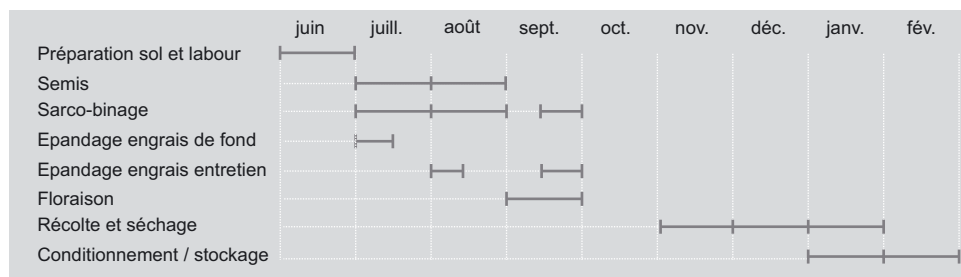
H. sabdariffa au Sénégal

Figure 3. Schéma de la phénologie moyenne d'*Hibiscus sabdariffa* au Sénégal définie à partir d'enquêtes de terrain.

sont mouchetés. Son cycle végétatif est assez long (165 j contre 140 j pour « Vimto ») et sa production de calices est inférieure à celle de « Vimto » (tableau I). La variété « Thaïlandaise » est surtout présente dans la région de Kaolack et plus particulièrement dans le département de Nioro du Rip. Elle a été introduite par l'ASNAPP-Sénégal et la fondation Éducation-Santé présidée par Mme Viviane Wade.

La variété « CLT 92 » est une variété à pigments bleu-violet ou rouge foncé introduit par VAPROVET. Pour cette variété, les rendements en calices secs sont estimés entre (250 à 300 kg·ha⁻¹) (tableau I).

Les variétés « Thaï » et « CLT 92 » ont été introduites récemment au Sénégal. Leur culture commence à se développer. Toutefois leurs caractéristiques ne sont pas encore tout à fait connues. Des travaux sont en cours pour une meilleure connaissance de leurs potentialités nutritionnelles et biochimiques en vue d'orienter leurs utilisations.

La variété « Burkinabé » a des caractéristiques morphologiques (calice) et agronomiques proches de celles de « Koor ». Sa coloration est proche de celle de « Vimto ». Elle est présente principalement dans les régions de Kolda et de Kaolack.

La variété « Yoump », très proche de « Koor », a un calice rouge de forme conique et à bractéoles relativement longues (2/3 de la longueur des sépales) et de grande taille. Son acidité est très faible. C'est une variété traditionnelle cultivée au centre du bassin arachidier, c'est-à-dire dans la région de Kaolack.

La variété Violette porte le nom de sa coloration. Elle pourrait dériver d'une hybridation naturelle entre la variété « Koor » et la variété « Yoump ». Elle est rencontrée au Sénégal oriental.

5. Pratiques agricoles

5.1. Culture

Le bissap est cultivé au Sénégal en période d'hivernage (saison des pluies) sur un cycle de (120 à 165) jours. Des cultures sous irrigation sont également possibles. Le semis est effectué en juillet-août, au début de la saison des pluies, à raison de (4 à 5) kg de graines par ha [13–15] (figure 3). Le semis se fait en poquets. Le semis direct en place est fait à raison de (3 à 5) graines par poquet, à une profondeur de (2 à 3) cm. Certains producteurs font des semis en pépinière ombragée, puis ils transplantent au champ les jeunes plants âgés de 4 semaines environ.

Les écartements utilisés sont en moyenne de (40 à 60) cm sur la ligne et de (60 à 90) cm entre les lignes, soit des densités de (18 500 à 41 500) plants·ha⁻¹ selon que le mode de production est intensif ou extensif [9].

Généralement, les producteurs, du fait d'un manque de moyens, n'ont pas recours à l'utilisation d'engrais chimiques. Ils utilisent le plus souvent des déjections animales (vache, cheval, mouton) pour apporter de la matière organique. Pendant la culture, les paysans appliquent rarement (voire pas du tout) des traitements phytosanitaires sur leur culture de bissap pour trois principales raisons : (1) le bissap est une plante robuste qui résiste bien aux insectes et autres parasites ; (2) la culture du bissap est encore pratiquée de manière extensive avec des variétés multiples et en mélange ; (3) après semis et apparition de la plante, un sarco-binage et un labourage de la terre sont effectués. En fonction de la pluviométrie, le paysan peut être amené à désherber le champ. Les traitements à appliquer en cas d'attaque parasitaire sont mal connus.

M. Cisse *et al.*

La superficie des cultures varie en moyenne de (0,25 à 5) ha par exploitation [2, 9]. Cependant, les petites superficies (0,25 ha) demeurent de loin les plus courantes. Elles sont souvent exploitées par des femmes.

Le bissap étant cultivé sur l'ensemble du territoire sénégalais, sa culture se fait donc sur tous les types de sols : les sols sableux profonds au nord et au centre du bassin arachidier, les sols sablo-argileux des plateaux de la basse et moyenne Casamance ou les sols gravillonnaires peu profonds de la haute Casamance et du nord-est du Sénégal oriental. Le bissap est essentiellement cultivé sur des terrains plats.

5.2. Récolte

Les calices se récoltent à la main, (2 à 3) semaines après la floraison, habituellement (4 à 6) mois après le semis, avant que le fruit ne se dessèche et ne s'ouvre [14]. Des cueillettes régulières prolongent la floraison.

Les enquêtes sur le terrain ont confirmé que la récolte est exclusivement réalisée par des femmes. À ce stade, les calices sont tendres et charnus. La cueillette s'effectue en prenant le calice dans une main et en l'arrachant d'un coup sec pour le détacher de la plante. Le critère de récolte le plus utilisé par les paysans est la couleur rouge vif caractéristique des calices. Ceux-ci sont rassemblés dans des paniers en osier ou en plastique, des sacs en plastique ou en jute qui servent à les transporter.

La récolte a lieu de novembre à janvier (*figure 3*) et la distribution des fleurs sur les marchés se déroule de décembre à mai. Au-delà du mois de mai, les calices séchés perdent de leur couleur et donc de leur valeur marchande.

Les rendements de culture, en fonction des variétés, varient entre (250 à 1000) kg de calices séchés par hectare et autant de graines [9]. Le rendement moyen en calices sec d'*H. sabdariffa* se situe autour de 250 kg·ha⁻¹. Le ratio massique [calices séchés / calices frais] est voisin de [1 / 10]. Le rendement en calices au Sénégal est 6 fois plus faible qu'en Asie où les rendements sont en moyenne de 1500 kg de calices sec par hectare [16, 17]. Cette différence

est probablement liée à la généralisation de l'utilisation d'engrais en Asie.

L'évolution de la production sénégalaise semble suivre celle des superficies puisque l'accroissement du rendement par hectare est relativement faible, voire nul, ce qui explique la faible vitesse d'accroissement de la production nationale. En d'autres termes, les superficies augmentent, alors que les pratiques agricoles ont peu évolué. Un simple apport d'engrais à une dose optimale et l'amélioration des pratiques agricoles pourraient rapidement augmenter de façon significative la production nationale.

5.3. Traitements postrécoltes

Après la récolte, interviennent les étapes de décortilage, séchage, conditionnement et stockage des calices secs d'*H. sabdariffa* (*tableau II*).

5.3.1. Le décortilage

Le décortilage est une opération manuelle, délicate et nécessitant une main-d'œuvre importante. Il consiste à prendre le fruit entre les deux mains puis à faire une incision verticale avec les deux pouces pour séparer la capsule et le calice (*figure 4*). Il est souvent pénible et douloureux à cause de la pression à exercer sur les calices et la capsule et, pour certaines variétés, la présence de poils urticants gênants.

Certaines opératrices coupent la base pédonculaire de la fleur à l'aide d'un couteau pour libérer la capsule et obtenir un calice circulaire fermé. Cette méthode peut endommager la capsule qui s'ouvre partiellement et libère les graines. Des pertes par brisure des sépales supérieurs sont fréquentes avec le couteau. Pour réduire ces pertes, certaines paysannes ne décortiquent les fleurs que 24 h après la récolte. Les discussions menées auprès des producteurs ont mis en évidence un réel besoin de mécanisation de cette opération qui constitue un frein important au développement de la culture.

5.3.2. Le séchage

Le séchage est effectué après le décortilage. Il permet de réduire l'humidité des calices

H. sabdariffa au Sénégal**Tableau II.**Caractéristiques de la récolte et des étapes de la postrécolte d'*Hibiscus sabdariffa* au Sénégal.

Opérations	Période	Conditions
Récolte	Novembre à janvier	<ul style="list-style-type: none"> • Réalisée par les femmes pour la plupart • 2 à 3 fois tous les 10 j • Manuelle avec un sécateur ou un couteau et une bassine
Décorticage	Novembre à janvier	<ul style="list-style-type: none"> • Exclusivement par les femmes et les enfants • Manuel avec ou sans couteau • Au plus tôt 24 h après la récolte
Séchage	Novembre à janvier	<ul style="list-style-type: none"> • Toile de nylon ou natte sur le sol • Claies disposée en hauteur (1,0 m du sol) • Au soleil, pendant (6 à 8) j • Ramassage des calices en fin de journée • Humidité finale 14–16 %
Conditionnement	Janvier	<ul style="list-style-type: none"> • Pour le marché sénégalais ou sous-régional : conditionnement en vrac ou en sachet individualisé • Pour l'exportation : conditionnement en sac de jute de 50 kg
Stockage	Février	<ul style="list-style-type: none"> • À l'air libre le plus souvent • Sous abri dans les marchés • Dans un local ordinaire avec d'autres produits agricoles ou non

de 86 % à 16 %, voire à 14 % pour une bonne conservation. Actuellement le séchage des calices en milieu rural se fait par exposition directe au soleil sur des nattes, des toiles ou des toiles en plastique étalées directement sur le sol (*figure 5*). Cette méthode présente des inconvénients majeurs : risque important de contamination microbienne, présence de sable et de débris divers, dégradation des anthocyanes. La durée du séchage est de (6 à 8) jours.

Pour se plier aux exigences des collecteurs et transformateurs, des soins doivent être apportés lors du séchage en vue d'obtenir des produits contenant le moins possible de corps étrangers (brindilles, sable, feuilles, etc.). Un système de séchage sur claies fabriquées à partir de sacs tissés en propylène a été testé lors de la campagne 2006 par l'ASNAPP-Sénégal dans le village de Thiaré et dans le département de Nioko du Rip dans la région de Kaolack (*figure 6*).

Quel que soit le mode de séchage au soleil, des pertes en anthocyanes et en acides organiques sont observées [18]. Des étu-

des sur les cinétiques de séchage et leur impact sur la qualité des calices devront être envisagées pour une meilleure maîtrise de cette étape.

Figure 4.Séance de décorticage d'*Hibiscus sabdariffa* dans le village de Thiaré au Sénégal.

M. Cisse *et al.*

Figure 5.
Séchage des calices
d'*Hibiscus sabdariffa* sur des
nattes à même le sol.



Figure 6.
Séchage des calices
d'*Hibiscus sabdariffa* sur des
claies.

5.3.3. Le conditionnement

Les calices séchés sont ramassés et vendus en vrac ou en sachets individuels dans toute l'Afrique de l'Ouest. Pour l'exportation, les calices séchés sont mis en ballots de 50 kg dans des sacs en propylène tissé. L'emballage des calices séchés dans des sacs en propylène est le mode le plus employé à cause de la bonne aération que permet ce genre d'emballage et de son faible coût. Le prix du sac varie entre (50 et 100) FCFA. Ce conditionnement est utilisé aussi bien par les producteurs que par les collecteurs.

5.3.4. Le transport et le stockage

Les résultats des enquêtes ont montré que le transport des calices secs d'*H. sabdariffa* entre les zones de production et les centres urbains se faisait par des camions d'une capacité de (15 à 30) t. Ce transport peut être effectué en même temps que celui d'autres productions telles que l'arachide, le mil et le maïs. Le prix dépend de la distance et se situe entre (10 et 20) FCFA·kg⁻¹.

Au cours des enquêtes, nous avons pu noter l'absence de structures spécifiques de stockage du bissap séché conditionné. Le plus souvent, les produits emballés ou en vrac sont stockés à l'air libre ou sous abri dans les grands marchés urbains, ou encore dans un local ordinaire polyvalent où sont stockés d'autres denrées. La durée de stockage est variable ; elle est fonction de la consommation ou de la commercialisation des calices d'*H. sabdariffa*. Ceux-ci peuvent être conservés jusqu'à la prochaine récolte. Cependant, selon les producteurs et commerçants interrogés, la couleur rouge des calices passe au brun noir à partir de 3 mois.

En conclusion, il ressort de notre étude qu'il n'existe pas de structures appropriées de décorticage, de séchage, de conditionnement et de stockage des calices d'*H. sabdariffa*. Ces opérations effectuées en l'absence d'infrastructure appropriée entraîneraient une dégradation importante de la qualité des calices.

6. Transformation

Les principales activités de transformation sont le concassage, la production de boisson, concentré et confitures.

6.1. Calices secs entiers ou concassés

Les fleurs séchées collectées sont triées, nettoyées et mises en sachet pour l'approvisionnement des populations urbaines à des fins domestiques pour la confection de jus de bissap. La Société SETEXPHARM (Étude et d'Exploitation des végétaux à usage Pharmaceutique), une société privée anonyme à

responsabilité limitée basée à Dakar, est en train de développer la commercialisation de bissap séché en sachet « prêt à l'emploi » en visant également les marchés régionaux et internationaux. Elle est actuellement la seule entreprise sur ce secteur du marché.

6.2. Production de boisson et concentré de bissap

La production de boisson est effectuée, de façon artisanale à partir de la transformation des calices d'*H. sabdariffa*, principalement par des groupements féminins qui alimentent d'une part les marchés et d'autre part les hôtels de Dakar et des zones touristiques. Les transformatrices rencontrées utilisent un ratio de 1 kg de calices secs pour 35 kg d'eau potable. Après macération pendant 3 h, l'extrait est filtré et sucré à une dose de 150 g de sucre·L⁻¹ de filtrat. D'autres ingrédients tels que de l'eau de fleurs d'oranger, des morceaux de fruits peuvent être ajoutés à la boisson. Certaines transformatrices effectuent une pasteurisation à des températures voisines de 100 °C pendant 10 min puis un conditionnement à chaud dans des bouteilles en verre.

Pour la fabrication de concentré de bissap, le ratio utilisé est de 1 kg de calices secs pour (5 à 10) kg d'eau potable. Après extraction et ajout de sucre, une évaporation par ébullition à pression atmosphérique est réalisée jusqu'à obtenir une solution plus ou moins concentrée. Faute de moyens techniques adéquats, d'un réfractomètre par exemple, les femmes utilisent leur savoir-faire et expérience pour déterminer la fin du chauffage.

6.3. Poudre de bissap et confitures

La production de confitures à partir du bissap est une activité marginale menée également par des groupements féminins de façon artisanale. Ces produits, auxquels peu de consommateurs sénégalais ont accès, sont destinés pour la plupart aux hôtels et aux grandes surfaces. Cela est dû à trois principales raisons : le coût de ces produits est relativement élevé ; ils ne sont pas disponibles dans les marchés et les boutiques

de quartier ; leur consommation ne fait pas l'objet de vulgarisation.

Des essais de production de poudre de bissap atomisée ont été menés avec succès par l'Institut de Technologie Alimentaire (ITA) de Dakar en partenariat avec le centre Wallon de Belgique (CWBI) et l'École Supérieure Polytechnique (ESP) de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD). Pour aider les transformateurs et transformatrices, l'ITA, en particulier, a mis en place des procédures et formules de fabrication de divers produits à partir des calices d'*H. sabdariffa* [19].

7. Les opérateurs de la filière

7.1. Opérateurs de production

Selon nos enquêtes, les producteurs de bissap peuvent être répartis en deux grands groupes : l'un, représenté par environ 70 % d'entre eux, est constitué par les producteurs traditionnels qui cultivent le bissap autour des champs des grandes cultures ; l'autre groupe, environ 30 % des producteurs, est constitué par les groupements féminins et groupement d'intérêt économique qui commencent à faire des parcelles de culture de bissap sur des superficies variant de (1 à 5) ha.

7.2. Opérateurs de transformation

Les transformateurs de bissap au Sénégal peuvent être répartis en deux groupes : les transformateurs artisanaux et les transformateurs industriels.

Les transformateurs artisanaux ne disposent pas souvent des équipements leur permettant d'appliquer correctement les procédés préconisés par l'ITA ou ne les maîtrisent pas. Aussi, l'ITA organise-t-il régulièrement des sessions de formation qui leur sont destinées. L'ITA, le CWBI et l'ESP ont mis en place en janvier 2008 une société (SODEBIO) à responsabilité limitée de développement des biotechnologies. Cette société commercialise actuellement de la poudre de bissap atomisée auprès de la société OASIS,

M. Cisse *et al.*

société sénégalaise dont l'activité principale est la vente de sucre et de boissons gazeuses, et du CWBI.

Plusieurs grandes sociétés industrielles sénégalaises se sont intéressées à la transformation des calices d'*H. sabdariffa* en commanditant des études sur le sujet pour une production à l'échelle industrielle aussi bien pour le marché local que pour celui d'exportation. Les principales contraintes qui ont été identifiées à cette échelle sont le manque d'homogénéité de la matière première compromettant la régularité de la qualité du produit (mélange de variétés) et, d'un point de vue technologique, la décoloration des boissons au cours du temps. Ainsi, jusqu'à présent, une seule entreprise industrielle, la « Laiterie du berger » située dans la région de Saint-Louis, propose une boisson en brique de 0,5 L.

8. Économie du bissap

8.1. Importance économique de la culture

Avec des superficies cultivées moyennes comprises entre (5 000 et 6 500) ha pour une production nationale de (1 200 à 3 000) t et une estimation de 30 000 à 40 000 producteurs, l'*H. sabdariffa* occupe actuellement une place importante, au Sénégal, dans la commercialisation des produits agricoles. À l'instar des cultures de rente, le bissap fournit aux producteurs de substantiels revenus. Bien que l'autoconsommation soit importante, la majeure partie de la production de calices est vendue soit sur les marchés locaux, soit sur ceux d'exportation.

Ainsi, nos enquêtes réalisées sur le terrain ont montré que, pour la région de Djourbel, pour 100 kg de calices récoltés, 30 kg sont autoconsommés tandis que le reste de la production est commercialisé. Sur 10 producteurs interrogés, 35 % consommeraient entre (20 et 35) % de leur production, tandis que 55 % en consommeraient moins de 20 %. Dans les régions de Kaolack et Fatick, sur 25 producteurs interviewés, ils seraient 40 % à consommer plus de 50 % de leur production, 20 % à en utiliser entre (30 et 50) %

et 35 % à en consommer moins de 20 %. Dans ces régions, sur 100 kg de calices récoltés, 55 kg sont destinées à l'autoconsommation.

La commercialisation des calices d'*H. sabdariffa* est assurée par les producteurs, les vendeurs ambulants et les grossistes établis le plus souvent au niveau des marchés urbains. Ces grossistes approvisionnent les exportateurs de calices secs. Mais, de plus en plus, pour répondre aux exigences de qualités de leurs clients, les exportateurs organisent le ramassage par secteur et par variété. Pour cela, ils travaillent, par contrat, en étroite collaboration avec les producteurs en leur fournissant les semences et les intrants agricoles. Par exemple, lors de la campagne 2006, ASNAPP-Sénégal, qui était sous contrat avec des producteurs, a proposé un prix de 750 FCFA·kg⁻¹ de calices secs. Ce prix a été jugé peu attractif par les producteurs concernés qui n'ont consenti à vendre à l'association qu'une partie de leur production. En effet, du fait de la perte de poids des calices frais après séchage, la commercialisation des calices secs s'avère plus favorable aux producteurs si elle se fait au volume plutôt qu'au poids. Lors de la campagne 2007, ce prix a été revu à la hausse à 800 FCFA·kg⁻¹ de calices secs de bissap.

Des négociations entre producteurs et opérateurs devraient permettre prochainement de définir clairement des modalités de commercialisation tenant compte des intérêts des deux parties.

8.2. Les marchés du bissap

8.2.1. Marché local

Les besoins en calices d'*H. sabdariffa* du marché national pour la transformation domestique et artisanale s'élèvent à 700 t. Au cours de nos enquêtes, nous avons pu constater que les calices de bissap sont le plus souvent vendus au volume, dans deux types d'unités de mesure : (1) une bassine d'une contenance moyenne de 5 kg de calices secs ; (2) une boîte de conserve de format 4/4 correspondant à une boîte de tomate de 2 kg, dont le contenu est d'environ 250 g de calices secs. Le prix des calices

H. sabdariffa au Sénégal

secs est très variable selon le lieu de commercialisation et la période de l'année.

Dans les marchés hebdomadaires, les prix de vente de la bassine oscillent de 2 000 FCFA au mois d'octobre, début de la récolte, à 5 000 FCFA à partir du mois de mai, soit de (400 à 1000) FCFA·kg⁻¹ de calices secs. Le prix de ces mêmes calices secs en boîte de conserve varie généralement de (125 à 175) FCFA pendant les mêmes périodes, soit entre (500 et 700) FCFA·kg⁻¹.

Sur les routes nationales et dans les grands centres urbains des régions, les prix pratiqués sont habituellement plus élevés que ceux observés sur les marchés hebdomadaires. La bassine qui est vendue à 2 500 FCFA au début de la récolte peut atteindre 7.000 FCFA en mai ou juin, soit une variation du prix de (500 à 1 400) FCFA·kg⁻¹ de calices secs. Le prix en boîte de conserve varie de (150 à 350) FCFA, soit de (600 à 1 400) FCFA·kg⁻¹ de calices secs. Sur les marchés de la région de Dakar, les calices de bissap sont essentiellement vendus au détail à un prix pouvant varier suivant la période de l'année de (200 à 500) FCFA pour l'équivalent d'une boîte de conserve de 2 kg, soit de (800 à 2000) FCFA·kg⁻¹ de calices secs.

8.2.2. Marché d'exportation

Les exportations de calices d'*H. sabdariffa* se font essentiellement vers les États-Unis et l'Europe, dont, notamment la France et l'Allemagne [20, 21], qui constitue 80 % du marché européen de l'ordre de 3 000 t de calices¹. Les calices exportés sont destinés à l'industrie alimentaire et cosmétique.

Le centre informatique de la douane sénégalaise fait état d'une exportation de 126 t de calices séchés en 1998, tandis que la Direction de l'horticulture reporte des exportations de 923 t en 1999/2000 et 312 t en 2000/2001. Les exportations de calices séchés de bissap en provenance du Sénégal ont beaucoup fluctué entre les années 1998 et 2005 (figure 7). Les tonnages exportés les plus élevés ont été enregistrés en 2003 et 2004 [22]. D'une façon générale, une nette augmentation a pu être observée au cours de ces dernières années, à l'exception de l'année 2002. Les faibles exportations de

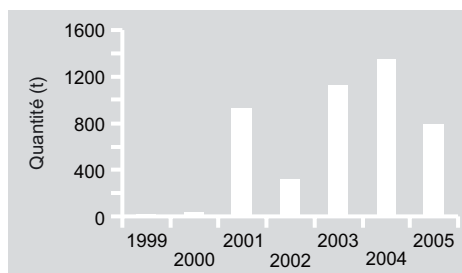


Figure 7. Évolution des exportations sénégalaises des calices de bissap (*Hibiscus sabdariffa*) [22].

cette année 2002 pourraient être expliquées par l'octroi d'une subvention de l'État sur les intrants agricoles et par la distribution de semences d'arachide qui ont occasionné un accroissement des superficies cultivées par des productions autres que le bissap. La baisse des exportations observée en 2005 pourrait être due à une rétention possible des produits de la part des producteurs dans l'espoir d'en obtenir de meilleurs prix que ceux offerts par le marché international, suite à la publicité faite autour d'un programme « bissap » lancé par l'État sénégalais. Les données d'exportations de 2006 et 2007 ne sont pas encore disponibles.

Les quantités exportées sont loin de couvrir la demande. En effet, avec les accords de l'*African Growth and Opportunity Act* (AGOA), les besoins du seul marché américain sont estimés à 30 000 t·an⁻¹.

Les prix sur le marché mondial connaissent de grandes fluctuations. La moyenne du marché se situant entre (1 000 et 2 500) \$US·t⁻¹. Les prix sont bien évidemment fonction de la qualité du produit qui est jugée principalement sur la variété du bissap, sa pureté variétale et le taux de calices entiers. Sur ce point, le Sénégal a beaucoup à gagner en développant les ressources nécessaires à la production de bissap en variété pure.

Étant donné que le bissap est une culture annuelle, les quantités offertes sur le marché peuvent fortement varier d'une année à l'autre, en fonction des facteurs climatiques et des performances économiques de l'année antérieure. Les quantités produites et offertes sur le marché ont une influence directe sur les prix des cours mondiaux.

Selon la SETEXPHARM, une société locale, les importateurs européens, notamment ceux d'Allemagne, préféreraient la

M. Cisse *et al.*

variété soudanaise (« Vimto »), plus foncée que celle cultivée au Sénégal. Après avoir multiplié la variété soudanaise, la SETEX-PHARM a distribué 20 t de semences dans plusieurs régions. Elle possède actuellement des points de vente dans la région de Tambacounda.

8.3. Programme d'appui à la production de bissap

Le bissap a été identifié parmi douze produits comme une culture mineure au Sénégal, mais qui présente un fort potentiel de revenus pour les producteurs [23].

Lors du conseil interministériel préparant la campagne agricole de 2005/2006, le gouvernement du Sénégal a décidé d'appuyer la culture du bissap. Ainsi, depuis 2005, le programme agricole de l'État sénégalais a doté la filière bissap de moyens supplémentaires dans le cadre de la politique de diversification des activités agricoles (4^e programme spécial) pour un montant annuel de 250 MFCFA. Les activités de ce programme sont la distribution de semences et d'engrais (subventionnées à 50 %), l'introduction de la production de bissap biologique, la formation et l'encadrement des producteurs et le développement de liens entre les producteurs et les acheteurs (marché local et exportation).

Les objectifs de ce programme seraient d'atteindre une superficie de 12 000 ha d'*H. sabdariffa* cultivés et une production de calices secs de 5 000 t. Il s'agit d'un programme très ambitieux qui ne devrait atteindre ses objectifs que d'ici (3 à 5) ans.

Le bissap fait par ailleurs partie des sept filières inscrites dans la cadre de la Stratégie de Croissance Accélérée (SCA) du gouvernement sénégalais, appuyée par l'USAID à travers le projet *Support for Accelerated Growth and Increased Competitiveness* (SAGIC) installé au Sénégal depuis 2006.

9. Conclusion

La filière bissap au Sénégal recèle de larges potentialités à travers le dynamisme de plus

en plus marqué de ses producteurs et exportateurs. Cependant, elle souffre d'un manque d'organisation, d'information et de support pour l'amélioration de sa productivité. Elle est par ailleurs confrontée à plusieurs problèmes tels que la faible disponibilité de semences certifiées, des technologies post-récoltes mal maîtrisées et l'inexistence de produits dérivés industriels ou semi-industriels fabriqués localement.

Une approche ciblée sur les besoins critiques de la filière devrait permettre de gagner en compétitivité, à travers des produits de qualité répondant aux besoins des marchés. L'amélioration de la production tant quantitative que qualitative devrait contribuer à l'accroissement des exportations et au développement des activités de transformations. Des structures comme l'ASNAPP-Sénégal et la Fondation Éducation-Santé encadrent depuis 2004 des groupements de femmes productrices de calices d'*H. sabdariffa*. C'est ainsi que, depuis 2005, du bissap biologique, certifié en 2006 par la société belge CERTISYS, est produit dans le département de Nioro du Rip (sud-est de la région de Kaolack).

Ces progrès touchant la filière auront vraisemblablement un impact positif sur l'accroissement des revenus des populations tant rurales qu'urbaines et cela d'autant plus que l'exportation est devenue une exigence par rapport à la stratégie de développement économique du Sénégal. Il existe un potentiel mondial notamment américain et européen de plus en plus important pour les calices d'*H. sabdariffa*. Dès lors, il importe d'identifier toutes les niches potentielles sur le marché mondial et de développer de nouveaux produits et des procédés de transformation porteurs pour les transformateurs et les petites et moyennes entreprises de l'agroalimentaire.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier ASNAPP-Sénégal et VAPROVET qui les ont associés à leurs différentes campagnes de terrain. Les remerciements s'adressent également au CDH à l'ISRA et à l'ITA (Sénégal).

H. sabdariffa au Sénégal

Ce travail bibliographique s'intègre dans le cadre du projet : « Couplage de procédés membranaires pour la production d'extrait anthocyaniques : application à *Hibiscus sabdariffa* L. » qui bénéficie d'un support financier du réseau des chercheurs en Génie des Procédés Appliqués à l'Agroalimentaire (GP3A) de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

Références

- [1] Morton J.F., Roselle, in: Dowling C.F. (Ed.), *Fruits of warm climates*, Media, Inc., Greensboro, NC, USA, 1987, pp. 281–286.
- [2] McClintock N.C., El Tahir I.M., *Hibiscus sabdariffa* L., in : Grubben G.J.H., Denton O.A. (Eds.), PROTA 2 (Plant Resources of Tropical Africa): vegetables [CD-Rom], PROTA Wageningen., Neth., 2004.
- [3] Lorenzo D., Atti-Serafini L., Santos A., Frizzo C.D., Paroul N., Paz D., Dellacassa E., Moyna P., *Achyrocline satureioides* essential oils from southern Brazil and Uruguay, *Planta Medica* 66 (2000) 476–477.
- [4] Nyarko G., Bayor H., Craigon J., Suleimana I.A., The effect of container types, seed dressings and desiccants on the viability and vigour of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L var. *sabdariffa*) seeds, *Pak. J. Biol. Sci.* 9 (4) (2006) 593–597.
- [5] Glew R.H., VanderJagt D.J., Lockett C., Grivetti L.E., Smith G.C., Pastuszyn A., Millson M., Amino acid, fatty acid, and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina Faso, *J. Food Compos. Anal.* 10 (1997) 205–217.
- [6] Babalola S.O., Babalola A.O., Aworh O.C., Compositional attributes of the calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa*), *J. Food Technol. Afr.* 6 (4) (2001) 133–134.
- [7] Cissé M., Dornier M., Sakho M., Ndiaye A., Reynes M., Sock O., Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations, *Fruits* 64 (3) (2009) (sous presse).
- [8] Kerharo J., Adam J.G., La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques, Vigot Frères, Paris, France, 1974.
- [9] Coly E.V., Seck P.A., Mbaye A.A., Les productions horticoles, in : Bilan de la recherche agricole et agroalimentaire au Sénégal 1964–2004, ISRA-ITA-CIRAD, Sénégal, 2005.
- [10] Diouf M., Diop M., Lô C., Drame K.A., Sene E., Ba C.O., Gueye M., Faye B., Prospection de légumes feuilles traditionnels de type africain au Sénégal, in: Chweya J.A., Eyzaguirre P. (Ed.), *Biodiversity of traditional leafy vegetables in Africa*, International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italie, 1999, pp. 111–150.
- [11] Diouf M., Lô C., Gueye M., Mbengue N.B., Sélection participative de nouveaux cultivars de quatre (4) espèces de légumes feuilles (*Hibiscus sabdariffa* L., *Amaranthus* L. spp., *Vigna unguiculata* (L.) Walp. et *Moringa oleifera* Lam.) au Sénégal, *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.* 7 (3) (2007).
- [12] Cissé M., Caractérisation de quelques fruits du Sénégal, stabilisation et concentration de jus de fruits tropicaux par des techniques membranaires, Univ. Cheikh Anta Diop de Dakar, Spéc. génie procédés, Thèse, Dakar, Sénégal, 2007.
- [13] Anon., Les cultures maraîchères au Sénégal : bilan des activités du CDH de 1972 à 1985, *Cent. Dév. Hortic. (CDH)*, Dakar, 1986, 265 p.
- [14] Beniest J., D'hort-Defrancq M., Coly E.V., De Maeyer L., Guide pratique du maraîchage au Sénégal, ClairAfrique, Dakar, *Cah. Inf.* 1, 1987, 144 p.
- [15] Anon., Les pépinières maraîchères en Afrique Soudano-sahélienne, FAO, Rome, Italie, 1998, 90 p.
- [16] Singh S.S., Principles and practices of agronomy, Kalyani Publ., New Delhi-Ludhiana, India, 1988.
- [17] Lakshminarayana A., Murty R.K., Rao M.R., Rao P.A., Efficiency of nitrogen utilization by roselle and kenaf (*Hibiscus sabdariffa*, *Hibiscus cannabinus*), *Ind. J. Agric. Sci.* 50 (1980) 244–248.
- [18] Juliani R.H., Diatta M., Hisham M., Wang M., Govindasamy R., Simon J., The quality control of *Hibiscus sabdariffa* (Bissap) from Senegal, ASNAPP-Rutgers and ASNAPP-Senegal, Senegal, 2005, 13 p.
- [19] Diémé O., Diop N., Formules artisanales de fabrication et de conditionnement des boissons à base de fruits locaux, Support Form., ITA, Dakar, Sénégal, 2007, 27 p.
- [20] Anon., Rapport annuel 2000, ISRA, Dakar, Sénégal, 2001, 78 p.
- [21] Guèye M., Le bissap une plante d'avenir, *Rural.-Bull. Trimest. ANCAR* 1 (2005) 14–15.
- [22] Anon., Statistiques sur les produits agricoles du Sénégal, Dir. Prot. Vég. (DPV), Minist. Agric., Dakar, Sénégal, 2005.
- [23] Anon., Étude diagnostique dans le secteur des produits naturels issus des plantes au Sénégal, ASNAPP, Dakar, Sénégal, 2005, 30 p.

M. Cisse *et al.***La producción del bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Senegal.**

Resumen — Zonas de producción. Introducido en el siglo XIX, *H. sabdariffa* se cultiva en todo el territorio de Senegal y en particular en las regiones de Kaolack, Djourbel, Thies, Saint-Louis y Louga. **Prácticas agrícolas.** En estas regiones, las superficies utilizadas varían entre (0,25 y 5) ha y son gestionados en su mayor parte por mujeres que se unen cada vez más en asociación o agrupación de interés económico. Se cultiva en el período de invernada en un ciclo de (120 a 165) días dependiendo de las prácticas tradicionales y por lo general sin el fertilizante. La cosecha y post cosecha de tratamiento se llevan a cabo manualmente, mientras que el secado se lleva a cabo en el sol y a menudo en el suelo. **Variedades.** Dos tipos de *H. sabdariffa* se reunió: el tipo verde y rojo tipo, que incluye principalmente cuatro variedades (Vimto, Koor, CLT 92 y Thai) con diferentes características. **Transformación.** Las principales actividades de procesamiento de cálices de *H. sabdariffa* son la trituración, la producción de concentrado, de bebidas, mermelada y de polvo instantánea. La fabricación de bebidas, la principal forma de transformación, llevada a cabo bajo la dirección de los grupos de mujeres se ha mantenido prácticamente artesanal. **Mercados.** Con un programa de apoyo del Estado senegalés, el aumento de áreas cultivadas y el número de agricultores, *H. sabdariffa* actualmente ocupa un lugar importante en la comercialización de productos agrícolas en Senegal. La exportación de cálices de *H. sabdariffa* a Europa y los Estados Unidos en los precios entre (1000 y 2500) \$US·t⁻¹ está aumentando año tras año.

Senegal / *Hibiscus sabdariffa* / cultivo de hortalizas / grupos de interés / procesamiento / mercados

Publication n°2

2-Le Bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations

Fruits, (2009), 64, (3) 179–193

Article de synthèse

Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations

Mady CISSE^{1, 2}, Manuel DORNIER^{1*}, Mama SAKHO², Augustin NDIAYE³, Max REYNES¹, Oumar SOCK²

¹ UMR 95 Qualisud,
Montpellier SupAgro, CIRAD,
TA B-95/16, F-34398
Montpellier Cedex 5, France
dornier@cirad.fr

² ESP, Dép. GCBA, 5085 Dakar
Fann, Sénégal

³ ITA, Route des Pères
Maristes, Dakar Hann, Sénégal

The bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition and principal uses.

Abstract — Introduction. *Hibiscus sabdariffa* L. is a herbaceous plant, cultivated largely in tropical and subtropical areas of both hemispheres. This plant is used for its fibre; mainly for its calyx, which is of three types: green, red and dark red. **Composition.** The red calyxes are the most used and are characterised by their concentration of anthocyanin, which can reach 1.5 g·kg⁻¹ of dry matter. Delphinidin 3-sambubioside and cyanidin 3-sambubioside are the major anthocyanins with, respectively, (71 and 29)% of total anthocyanins. Organic acids, minerals and amino acids are present in the calyx, leaves and seeds of *H. sabdariffa* at variable levels depending on the variety and geographical area. **Uses.** The uses of different parts of *H. sabdariffa* are many and varied both in food and in traditional medicine. The calyx, with high concentration of acids, vitamin C and especially anthocyanins, is the most used part of the plant. It is mainly used for the production of soft drinks and tonic without alcohol. The seeds of *H. sabdariffa*, with their richness in protein (26%), fat (20%) and total sugars (40%), are widely used in the diet in many African countries. The leaves are a good source of nutrients and are used in Africa in the preparation of sauces.

Senegal / *Hibiscus sabdariffa* / calyx / leaves / seeds / anthocyanins / proximate composition / uses

Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations.

Résumé — Introduction. *Hibiscus sabdariffa* L. est une plante herbacée, vivace, localisée dans les zones tropicales et subtropicales des deux hémisphères. L'espèce est exploitée pour sa fibre et principalement pour ses calices qui sont de trois types : vert, rouge et rouge foncé. **Composition.** Les calices de type rouge sont les plus utilisés et se caractérisent par leur concentration élevée en anthocyanes qui peut atteindre 1,5 g·kg⁻¹. La delphinidine 3-sambubioside et la cyanidine 3-sambubioside sont les anthocyanes majoritaires avec, respectivement, (71 et 29) % des anthocyanes totaux. Les acides organiques, minéraux et acides aminés sont présents dans les calices, feuilles et graines d'*H. sabdariffa* à des teneurs variables suivant la variété et la zone géographique. **Utilisations.** Les utilisations des différentes parties de l'*H. sabdariffa* sont nombreuses et variées aussi bien dans l'alimentation que dans la médecine traditionnelle. Les calices, du fait de leur concentration élevée en acides, vitamine C et surtout en anthocyanes, constituent la partie de la plante la plus valorisée. Ils sont surtout utilisés pour la production de boissons désaltérantes et tonifiantes sans alcool. Les graines d'*H. sabdariffa* de par leur richesse en protéine (26 %), lipides (20 %) et sucres totaux (40 %) sont très utilisées dans l'alimentation dans de nombreux pays africains. Les feuilles constituent une bonne source de nutriments et sont utilisées en Afrique pour la préparation de sauces.

Sénégal / *Hibiscus sabdariffa* / calice / feuille / graine / anthocyane / composition globale / utilisation

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 4 juin 2008
Accepté le 24 août 2008

Fruits, 2009, vol. 64, p. 179–193
© 2009 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits/2009013
www.fruits-journal.org

RESUMEN ESPAÑOL, p. 193

1. Introduction

Plus de 500 espèces d'*Hibiscus* sont connues dans le monde. Ces plantes se rencontrent à la fois dans les régions tropicales et subtropicales. Elles possèdent des calices de couleur verte ou rouge. La majorité des variétés sont utilisées comme plantes ornementales à l'exception du type *sabdariffa* dont deux variétés ont été identifiées [1, 2]. Il s'agit d'*Hibiscus sabdariffa* variété *altissima* et d'*Hibiscus sabdariffa* variété *sabdariffa* L.

Hibiscus sabdariffa L. est une plante de grande taille, vigoureuse, peu ramifiée et très fibreuse [3]. Elle est d'ailleurs cultivée principalement pour ses fibres. La variété *sabdariffa* L. est une plante touffue pourvue de calices comestibles. Les investigations qui suivent portent essentiellement sur cette dernière variété (figure 1).

Du fait de la crise du secteur agricole, la culture de *H. sabdariffa* est devenue pour certaines localités du Sénégal, en particulier pour le bassin arachidier de la zone centre, une possibilité de diversification de la monoculture de l'arachide [4]. Notre étude bibliographique propose une sélection et une compilation des informations disponibles dans la littérature sur la composition et les utilisations de la plante. Il s'agit d'une synthèse générale destinée à mieux appréhender le potentiel de cette production.

2. Composition

2.1. Calices

Les calices d'*H. sabdariffa*, principale partie comestible de la plante, ont une composition très variable (tableau I) [1, 2, 5–7].

Excepté pour les teneurs en eau et en lipides, les écarts entre les valeurs minimales et maximales des différents éléments considérés sont importants. Cette variabilité peut être due à plusieurs facteurs tels les conditions de culture, la nature des sols, la pluviométrie et le pays d'origine des calices [1, 2]. La variété est aussi un élément majeur des différences de composition observées [7].

Les calices d'*H. sabdariffa* sont riches en acides organiques. Les acides succinique, oxalique, tartrique et malique sont présents à des concentrations respectives de [(0,51, 0,43, 0,17 et 0,12) g·100 g⁻¹] [6, 9]. Les acides succiniques et oxaliques constituent les deux acides organiques majoritaires d'*H. sabdariffa*. À eux deux, ils représentent 76 % des acides organiques totaux. La teneur en acide ascorbique est très variable même au sein d'espèces cultivées dans la même zone géographique comme cela a été montré au Nigéria [7]. Les sucres présents dans les calices d'*H. sabdariffa* sont constitués de glucose, fructose et saccharose. Le glucose, avec près de 40 % des sucres totaux, est le sucre majoritaire [6].

L'étude de la composition en minéraux de calices d'*H. sabdariffa* mise en parallèle avec les concentrations maximales autorisées dans l'alimentation humaine révèle une forte variabilité, fonction de la zone géographique de production (tableau II) [7, 10–13]. Dans ces calices, on constate la présence d'oligoéléments, tels que le chrome et le cuivre, alors que d'autres éléments n'ont été mis en évidence que dans certaines origines ; c'est le cas, par exemple, du plomb et du nickel détectés dans les seuls calices des cultures du Mali.

La variété influence également la composition minérale [6]. Ainsi des différences significatives ont été observées pour les teneurs en fer, sodium, et potassium selon les variétés rouge et rouge foncée d'*H. sabdariffa*. Globalement, il apparaît que les calices d'*H. sabdariffa* constituent une bonne source d'éléments essentiels (Ca, Cu, Fe, K, Mn, Zn). À l'exception de la teneur en plomb, toutes les valeurs rapportées sont au-dessous du seuil admissible défini par l'organisation mondiale de la santé [10–12] ; elles ne peuvent donc pas constituer un risque sanitaire pour les consommateurs d'*H. sabdariffa*. Cependant, la teneur en éléments minéraux des plantes dépend de nombreux facteurs parmi lesquels on peut citer les conditions géo-climatiques environnantes, les activités humaines à proximité du champ et les pratiques culturales utilisées. Pour s'assurer de la qualité de la matière végétale, il y aurait lieu d'effectuer une analyse plus systématique de la composition

Composition et principales utilisations du bissap

des calices en ces éléments minéraux qui, pour certains, sont des métaux lourds.

La présence de β -carotène et de lycopène à des concentrations respectives de $1,9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ et $164,3 \text{ } \mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de matière fraîche a été signalée dans des calices d'*H. sabdariffa* [6]. Ces calices contiendraient également des mucilages et des pectines [14–16], ainsi que tous les acides aminés essentiels (*tableau III*) [2, 17, 18]. Plus de 37 composés volatils y ont été également identifiés parmi lesquels le 1-hexanol, le nonanal, le limonène, le linalool à des concentrations respectives de (21,9, 3,9, 2,3, 1,0) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de matière sèche [15].

Une des caractéristiques d'*H. sabdariffa* est également sa richesse en anthocyanes (calices secs, teneur comparable à la mûre et supérieure à la plupart des autres végétaux comestibles (*tableau IV*) [19]. Deux à quatre anthocyanes ont été identifiés selon les variétés d'*H. sabdariffa* considérées [20–26]. Il s'agit de la delphinidine 3-sambubioside ou hibiscine, de la cyanidine 3-sambubioside ou gossypicyanine, de la delphinidine 3-glucoside et de la cyanidine 3-glucoside. La delphinidine 3-sambubioside est l'anthocyane majoritaire responsable de la couleur rouge-violette des calices [27–28]. Il représente 70 % de la teneur totale en anthocyanes. Les calices d'*H. sabdariffa* contiennent également d'autres composés polyphénoliques notamment de l'acide protocatéchique [29, 30].

L'activité antioxydante des anthocyanes confère aux boissons à base d'*H. sabdariffa* des propriétés antioxydantes intéressantes, bien qu'environ 10 fois moins élevées que celles du vin rouge [31]. Les anthocyanes sont responsables à 50 % de l'activité antioxydante totale du produit. Des études ont montré que les deux anthocyanes majeurs d'*H. sabdariffa*, la delphinidine 3-sambubioside et la cyanidine 3-sambubioside, sont rapidement absorbés dans le tractus gastro-intestinal chez le rat, ce qui laisse présager une bonne biodisponibilité [31].

La mesure des activités anti-radicalaires d'extraits d'anthocyanes d'*H. sabdariffa* obtenus par macération de calices dans un mélange éthanol-acide trifluoroacétique



Figure 1.
Hibiscus sabdariffa, variété *sabdariffa* : (a) tige, feuilles et calices de la variété Koor ; (b) fleur ; (c) fruit et calice de la variété Koor à 120 jours de culture.

[99 / 1] (vol. / vol.) a révélé des propriétés comparables à celles de l'acide ascorbique [26].

M. Cisse *et al.***Tableau I.**Valeurs minimales, maximales et moyennes des différentes caractéristiques des calices frais d'*Hibiscus sabdariffa* [1, 2, 5–8].

Type de données	Humidité	Protéines	Lipides	Fibres	Cendres	Glucides	Acide malique	Calcium	Fer	Phosphore	Acide ascorbique	Anthocyanes
	(g·100 g ⁻¹)							(mg·100 g ⁻¹)				
Minimales	84,5	0,9	0,1	2,5	4,5	3,3	0,12	1,3	2,9	40,0	6,7	150
Moyenne ¹	86,3 (8)	6,6 (8)	2,3 (7)	8,8 (6)	5,6 (5)	8,1 (4)	1,36 (3)	94,0 (9)	17,2 (9)	191,1 (6)	72,0 (6)	350 (5)
Maximales	89,5	17,9	3,9	12,0	6,8	12,3	2,70	213,0	37,8	312,6	141,1	1500

¹ Entre parenthèses : le nombre de valeurs pris en compte dans le calcul de la moyenne.**Tableau II.**Composition en minéraux des calices d'*Hibiscus sabdariffa* (mg·100 g⁻¹ de matière sèche) et teneur maximale autorisée dans l'alimentation humaine [1, 10–13].

Origine des calices	Calcium	Cuivre	Chrome	Fer	Magnésium	Manganèse	Nickel	Phosphore	Plomb	Potassium	Sodium	Zinc
Nigéria [1]	1583	Non déterminé	–	37,8	316	Non déterminé	–	Non déterminé	–	2060	5,5	6,5
Mali [10]	Non déterminé	0,6	0,6	40	Non déterminé	24	0,31	Non déterminé	0,18	Non déterminé	Non déterminé	3,7
Teneur ou dose maximale autorisée	–	4	12	45 ¹	–	2–5 ¹	1	–	0	–	–	6

¹ Doses exprimées en mg·j⁻¹**Tableau III.**Composition en acides aminés (mg·g⁻¹ de matière sèche) des calices et graines d'*Hibiscus sabdariffa*.

Organe considéré	Ala	Arg	Asp	Cys	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Calices [2]	3,70	3,60	16,30	1,30	7,20	3,80	1,50	3,00	5,00	3,90	1,00	3,20	5,60	3,50	3,00	–	2,20	3,80
Graines [17, 18]	4,37	10,58	10,64	2,65	22,47	4,69	2,35	3,25	6,80	5,51	1,25	5,18	3,72	4,48	3,80	0,51	3,46	3,57

Cependant, les anthocyanes d'*H. sabdariffa* sont réputés pour leur instabilité [19, 32–34]. Ils sont facilement dégradés pendant les traitements thermiques ou durant leur stockage à température ambiante. Après chauffage, la coloration rouge vire progressivement au brun. Cette instabilité, aussi bien dans des solutions aqueuses simples que dans des formulations complexes de produits alimentaires, est le principal facteur limitant de l'utilisation des extraits d'*H. sabdariffa* comme colorant. Une plus grande

stabilité ouvrirait à cette variété le marché des colorants naturels qui, évalué à 940 M USD, enregistre une croissance annuelle de l'ordre de 5 % comparé à celui des colorants artificiels (400 M USD), qui lui n'augmente que de (2 à 3) % par an [35].

2.2. Graines

À partir d'un échantillon de 1000 graines, il a été mesuré que la graine d'*H. sabdariffa* avait un diamètre moyen principal de

Composition et principales utilisations du bissap

Tableau IV.

Principaux anthocyanes et teneurs trouvés dans certains fruits [19].

Fruits	Anthocyanes	Teneur (mg·100 g ⁻¹)
Black chokeberry (<i>Aronia melanocarpa</i>)	Cy 3-galactoside Cy 3-arabinoside Cy 3-syloside	1050
Cerise sucrée (<i>Prunus avium</i> var. <i>Bigareau</i>)	Cy 3-rhamnoglucoside Cy 3-glucoside Pn 3-rutinoside	350–450
Cerise aigre (<i>Prunus cerasus</i> L. var. <i>Montmorency</i>)	Pn 3-rutinoside Cy 3-glucoside Cy 3-rutinoside Cy 3-sophoroside Cy 3-2 ^G glucosylrutinoside	35–82
Prune (<i>Prunus salicina</i> cv. <i>Sordum</i>).	Cy 3-rhamnoglucoside Cy 3-glucoside	30
Myrtille (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	Dp 3-galactoside Dp 3-arabinoside Mv 3-galactoside Mv-arabinoside	25–495
Canneberge (<i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.)	Pn 3-galactoside Pn 3-arabinoside Cy 3-galactoside Cy 3-arabinoside	78
Framboise noire (<i>Rubus</i> spp. var. <i>Cumberland</i>)	Cy 3-glucoside Cy 3-rutinoside Cy 3-sambubioside Cy 3-xylosylrutinoside	428
Fraise (<i>Fragaria</i> spp.)	Pg 3-glucoside Cy 3-glucoside	450–700
Raisin (<i>Vitis vinifera</i> L.)	Mv 3-monoglucoside Pn 3-monoglucoside Dp 3-monoglucoside Mv 3-monoglucoside-p-coumarate Pn 3-monoglucoside-p-coumarate	30–750
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Dp 3-sambubioside Cy 3-sambubioside Dp 3-glucoside Cy 3-glucoside	150
Mûre (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	Cy 3-glucoside Cy 3-rutinoside	67–230
Orange sanguine (<i>Citrus sinensis</i> L.)	Cy 3-glucoside Cy 3-(4"-acetyl)-glucoside	70–100

M. Cisse *et al.***Tableau V.**Composition des graines d'*Hibiscus sabdariffa* (g·100 g⁻¹) [2, 17, 18].

Type de données	Humidité	Protéines	Lipides	Fibres	Cendres	Glucides
Minimum	5,6	19,6	16	1,2	4,8	23,8
Moyenne ¹	9,3 (8)	26,2 (8)	20,2 (8)	9,0 (7)	5,9 (7)	40,4 (7)
Maximum	12,9	31,0	23,3	16,8	7,0	51,7

¹ Entre parenthèses : le nombre de valeurs pris en compte dans le calcul de la moyenne.**Tableau VI.**Composition moyenne en acides gras de la graine d'*Hibiscus sabdariffa* [17, 40–42].

Acide gras	% des lipides totaux ¹	
C14:0	Myristique	0,31
C16:0	Palmitique	21,65
C16:1	Palmitoléique	0,44
C18:0	Stéarique	5,47
C18:1	Oléique	30,90
C18:2	Linoléique	39,16
C18:3	γ -linoléique	0,57
C20:0	Arachidique	0,72
C20:1	Eicosénoïque	0,08
C20:3	Eicosatriénoïque	0,34
C22:0	Behénique	0,37

¹ Moyenne des valeurs données par les références.

5,6 mm, un diamètre intermédiaire de 5,2 mm et minimal de 2,8 mm. Le poids de ces 1000 graines est de 35,6 g [36].

La chaleur spécifique de la graine à 80 °C est de 2,97 kJ·kg⁻¹·K⁻¹. Cette valeur est comprise dans l'intervalle de (2,1 et 5,3) kJ·kg⁻¹·K⁻¹ rapportés pour différentes graines oléagineuses [37]. La connaissance de la chaleur spécifique est utile lors du traitement thermique des graines, afin de pouvoir prévoir son comportement à la chaleur.

Les éléments trouvés dans les calices d'*H. sabdariffa* se retrouvent également dans les graines, cependant leurs teneurs sont généralement plus importantes dans les graines que dans les calices (tableau V) [2, 17, 18].

Les graines d'*H. sabdariffa* présentent des concentrations très importantes en protéines (26 %), lipides (20 %) et sucres totaux (40 %). Les glucides sont constitués de saccharose, glucose et amidon à des teneurs moyenne respectives de (17,6, 4,0 et 16,1) g·100 g⁻¹ de graines entières fraîches. Ce sont donc de bonnes sources de protéines et de lipides.

L'acide glutamique (22 %), la glycine (18 %) et l'acide aspartique (11 %) sont les acides aminés majoritaires dans les graines (tableau III) [17, 18]. Tous les acides aminés essentiels sont présents, cependant, dans ce groupe, la leucine (7 %), la phénylalanine (5 %) et la thréonine (4 %) sont les plus représentées.

La concentration totale en acides aminés essentiels de la référence protéique de la FAO [17] est de 36 g·100 g⁻¹ de protéine, alors qu'elle est de 39,5 g·100 g⁻¹ de protéine pour les graines d'*H. sabdariffa*. Selon le modèle de référence de la FAO, les acides aminés limitants seraient la valine, l'isoleucine, et le tryptophane, tandis que tous les acides aminés soufrés ne le seraient pas. La teneur en lysine des graines est identique à celle de la protéine de référence de la FAO. Il serait donc envisageable d'utiliser les graines d'*H. sabdariffa* pour enrichir en lysine des aliments qui en sont déficients.

Avec une teneur moyenne de 20 %, la graine d'*H. sabdariffa* présente une richesse en huile proche de celle d'autres graines comme celles de la tomate [38] ou des fruits du baobab [39]. L'huile brute des graines est un liquide de couleur jaune verdâtre à température ambiante qui se compose à plus de 70 % d'acides gras insaturés (tableau VI) [17, 40–42]. L'acide linoléique

Composition et principales utilisations du bissap

Tableau VII.Principales caractéristiques physico-chimiques de l'huile brute des graines d'*Hibiscus sabdariffa* [41, 42].

Références	Acidité (% acide oléique)	Indice de peroxyde (mEq·kg ⁻¹)	Indice de réfraction à 40 °C	Densité à 25 °C (kg·L ⁻¹)	Viscosité à 25 °C (cP)	Indice d'iode (g·100 g ⁻¹)	Indice de saponification (mg KOH·g ⁻¹)	Stabilité à l'oxydation (h)
[41]	2,24	8,63	1,48	0,92	15,85	Non déterminé	Non déterminé	15,53
[42]	Non déterminée	11,86	1,47	0,92	Non déterminée	81,45	194,95	Non déterminée

Tableau VIII.Composition en minéraux (mg·100 g⁻¹) des graines de trois cultivars d'*Hibiscus sabdariffa* [47].

Cultivars d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> identifiés à partir de la couleur des calices	Calcium	Magnésium	Manganèse	Potassium	Sodium	Fer	Zinc
Rouge clair	620	460	4,1	1300	620	9,1	5,6
Rouge	590	480	3,9	1390	590	9	5,5
Rouge foncé	680	420	4,0	1350	680	8,8	5,9

(C18:2) est le plus abondant (39 %) ; il est suivi de l'acide oléique (C18:1) à une concentration de 31 %. L'acide palmitique (C16:0) est l'acide gras saturé le plus abondant (21 %) ; il est suivi de l'acide stéarique (C18:0), avec une teneur de 6 %.

Les propriétés physiques et chimiques de l'huile brute révèlent que l'huile a un indice de saponification élevé mais un indice d'iode faible (*tableau VII*) [41, 42]. Ce dernier indice indique le degré d'insaturation tandis que l'indice de saponification reflète le poids moléculaire moyen. Les valeurs de l'indice de réfraction et de la densité spécifique sont dans la gamme des valeurs observées dans la plupart des huiles végétales brutes [43]. L'indice de peroxyde qui indique l'état d'oxydation de la matière grasse est légèrement élevé pour une huile brute (10 mEq·kg⁻¹). La viscosité de l'huile d'*H. sabdariffa* est inférieure à celle des huiles de maïs, de soja et d'olive [44, 45].

L'huile présente une valeur de stabilité à l'oxydation très élevée de 15 h qui pourrait être partiellement attribuée à son contenu élevé en tocophérol, de l'ordre de 2 g·kg⁻¹ [43]. Cette concentration est deux fois plus élevée que celle rencontrée dans l'huile des

graines de tomate [38], six fois plus que celle de l'huile d'olive qui contient en moyenne 350 mg·kg⁻¹ de tocophérol [45] et 20 fois plus que celle de l'huile de pépins de raisin [46]. Le tocophérol le plus abondant dans l'huile de graines d'*H. sabdariffa* est le γ -tocophérol. Les teneurs en α -, γ -, et δ -tocophérol sont respectivement de (25,0, 74,5 et 0,5) % ; ils sont semblables aux teneurs mesurées dans l'huile de maïs raffinée [(17, 78, 3) %] [41]. Les graines d'*H. sabdariffa* constituent donc une bonne source d'antioxydants liposolubles.

L'analyse de la composition en minéraux des graines provenant de trois cultivars d'*H. sabdariffa* révèle que potassium, sodium, magnésium et calcium sont les constituants majoritaires, alors que manganèse, fer et zinc sont présents en faible quantité (*tableau VIII*) [8]. Le cultivar rouge foncé présente les teneurs les plus élevées en potassium et sodium.

La graine d'*H. sabdariffa* contient plus de 25 composés volatiles [47] dont des hydrocarbures, des alcools, et des aldéhydes (C₈ à C₁₃). Ces composés sont importants pour l'arôme de l'huile dont la typicité peut être mise à profit en cuisine. Ils peuvent être

M. Cisse *et al.***Tableau IX.**Principales caractéristiques des feuilles d'*Hibiscus sabdariffa* [2, 48].

Références	Eau	Protéines	Lipides	Glucides totaux	Fibres	Cendres	Acide malique	Calcium	Phosphore	Fer	-carotène	Thiamine	Riboflavine	Niacine	Acide ascorbique
	(g·100 g ⁻¹)							(mg·100 g ⁻¹)							
[2] Philippines	86,2	1,7	1,1	10,0	–	1,0	1,3	180,0	40,0	5,4	–	–	–	–	–
Guatemala	89,2	1,1	2,6	–	12,0	6,9	–	1,3	273,2	9,0	0,03	0,1	0,3	3,8	6,7
[48]	85,6	3,3	0,3	9,2	1,6	–	–	213,0	93,0	4,8	4,10	0,2	0,5	1,2	54,0

Tableau X.Différentes utilisations alimentaires de l'*Hibiscus sabdariffa*.

Partie de la plante	Exemples d'utilisation	Références
Calice	Fabrication de glace	[1, 5, 8, 32, 40]
	Fabrication de gelée, confiture	
	Préparation de boissons et infusions	
	Ingrédients dans les aliments	
	Vin	[52]
	Vinaigre	[53, 54]
Feuille	Sauces aigres	[49]
	Légumes feuilles	[2, 51, 53]
Graine	Fabrication de condiments	[55–57]
	Produit de substitution de la viande	[58]
	Production de farine	[17, 18, 41]
	Production d'huile	

utiles pour l'identification d'huiles provenant de graines de différentes origines géographiques.

2.3. Feuilles

La variabilité observée au niveau des calices et des graines d'*H. sabdariffa* cultivé dans différentes régions se retrouve également pour la composition des feuilles (*tableau IX*) [2, 48]. Par exemple, les teneurs en phosphore et fer seraient respectivement de (40 et 5) mg·100 g⁻¹ pour des feuilles de plantes cultivées aux Philippines alors qu'elles seraient respectivement de (273 et 9) mg·100 g⁻¹ pour des feuilles provenant du Guatemala. Ces feuilles constituent une bonne source de nutriments, c'est pourquoi elles entrent dans l'alimentation des populations rurales des pays producteurs [49–51].

3. Utilisations d'*H. sabdariffa*

Toutes les parties des plants d'*H. sabdariffa* (calice, tige, feuille) sont utilisées soit dans l'alimentation, soit dans la médecine traditionnelle, soit dans l'industrie textile.

3.1. Utilisations alimentaires

L'espèce *H. sabdariffa* est utilisé dans l'alimentation humaine et dans l'industrie agro-alimentaire. La plante est exploitée pour ses calices, feuilles et graines (*tableau X*).

3.1.1. Calices

Les calices, du fait de leur concentration élevée en acides, pectines, vitamine C et surtout en anthocyanes, constituent la partie de la plante la plus utilisée. Ils interviennent dans la production de boissons désaltérantes et tonifiantes sans alcool.

Ces boissons sont toutes élaborées à partir d'un extrait aqueux obtenu après trempage des calices dans de l'eau chaude ou à température ambiante. Après filtration, du sucre ainsi que d'autres ingrédients, tels que d'autres jus de fruits, des aromatisants, des morceaux de fruits (ananas, fraise, gingembre), etc., peuvent être ajoutés selon le pays pour la confection de la boisson finale. Cette boisson largement répandue en Afrique et en Asie est connue sous plusieurs appellations. Au Sénégal où elle est très appréciée, elle est nommée « *bissap* » et sa consommation est maximale pendant le mois de ramadan. Au Mali, en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso, la boisson est appelée « *da bilenni* ». En Égypte, elle est plus connue sous la dénomination de « *boisson des pharaons* ». Au Soudan l'appellation « *thé de karkadé* »

Composition et principales utilisations du bissap

Tableau XI.Propriétés médicinales de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*.

Laxatif et diurétique [1, 2]
Effet hypotenseur chez les chiens et rats [1, 2, 64, 65]
Effet hypotenseur chez l'homme [67]
Anti-hypertensif et effet cardio-protecteur <i>in vivo</i> [68]
Effet protecteur contre l'oxydation dans des hépatocytes de souris [69]
Protection contre la peroxydation lipidique <i>in vitro</i> [71]
Diminution du taux de cholestérol et effet antioxydant chez le rat [71]
Activité anti-athérosclérotique [65, 74]
Inhibiteur des dommages hépatiques induits par des lipopolysaccharides chez les souris [76, 77]
Effet hépatoprotecteur chez les souris et rats [77, 78]
Réduction de l'hépatotoxicité induit par le paracétamol chez les souris [72]
Activités anti-inflammatoire chez les souris [80]
Effet protecteur <i>in vitro</i> contre le cancer de la peau chez des souris [82]
Inhibe l'augmentation <i>in vitro</i> de l'hépatome [82]
Inhibe l'oxydation des lipoprotéines de basse densité et préviennent l'hyperlipidemia chez les rats [83, 84]
Anti-leucémique <i>in vitro</i> , anti-oxydant <i>in vivo</i> , et antalgique [76, 77]
Anti-bactérien et anti-fongique [85]
Effet protecteur contre la fibrose du foie chez le rat [86]

est courante ; cette boisson est alors consommée froide ou chaude selon la saison. En Jamaïque, une boisson traditionnelle de Noël est préparée à partir de calices d'*H. sabdariffa* avec du gingembre, du sucre et de l'eau bouillante. Le liquide est filtré et servi avec de la glace et souvent avec du rhum. Au Nigéria, la boisson, appelée « *zobo* », est tout autant appréciée par toutes les couches sociales de la population. Dans ce pays, sa popularité s'est récemment accrue en raison des vertus médicinales qui lui sont attribuées et de l'augmentation par ailleurs du prix d'autres boissons non alcoolisées importées. En Malaisie, la boisson attire l'attention de beaucoup de fabricants de jus de fruits, tandis qu'elle est traditionnellement très consommée en infusion ou boisson fraîche en Thaïlande.

La production de confiture, gelée et dessert à partir des calices est aussi largement répandue. Les confitures d'*H. sabdariffa* sont appréciées aux États-Unis, en Australie, au Sénégal, dans les Caraïbes et en Asie [3]. Les calices sont utilisés également pour fabriquer une boisson fermentée alcoolisée qui s'apparenterait à du vin [52].

Les extraits de calices sous forme de concentré ou de poudre séchée sont utilisés comme colorant naturel dans les industries alimentaires (pâtisserie, jus de fruits, boissons, etc.) et pharmaceutiques. Cependant, actuellement, leur emploi est limité et pose problème du fait de l'instabilité des pigments lors de la conservation du produit [21, 27, 36].

3.1.2. Graines

Les graines d'*H. sabdariffa* sont riches en protéines, aussi, au Bénin, sont-elles utilisées pour la fabrication de condiments traditionnels par cuisson puis fermentation. Différents produits appelés « *iru* », « *afitin* », « *sonru* » ou « *yanyanku* » sont obtenus en fonction de la durée de fermentation. Des produits similaires sont trouvés dans d'autres régions comme le « *dawadawa* » au Nigéria et au Ghana [55], le « *dadawa basso* » et le « *dadawa kalwa* » au Nigéria [56], le « *soumbala* » au Burkina Faso [59], le « *nététu* » au Sénégal [60], le « *natto* » au Japon et le « *kinema* » au Népal [57, 61]. Au nord du Nigéria, les graines sont fermentées en présence de quelques épices pour préparer un

Tableau XII.Utilisations traditionnelles de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*.

Pouvoir fortifiant et purificateur du sang
Les préparations à base de feuilles soignent les plaies et les ulcères [1]
Inhibition de la formation de caillots dans les reins [66]
Hypertension [67]
Désordres du foie [9, 67, 69, 70]
Anti-spasmodique [1]
Antimicrobienne et antifongique [5, 26]
Lutte contre les maladies cardiovasculaires et hépatiques [72, 73]
Antiseptique, aphrodisiaque, astringent digestif [75]
Apéritif et tonifiant [1, 2]
Remèdes contre le cancer, les abcès [53]
Thérapie locale pour l'anémie [79]

aliment connu sous le nom de « *munzantusa* » [41]. Au Soudan et au Nigéria, elles sont utilisées pour élaborer un produit de remplacement de la viande appelé viande d'oseille, le « *furundu* », qui est traditionnellement préparé en faisant fermenter, pendant 9 jours, les graines préalablement cuites [58].

Les graines contiennent environ 20 % de matières grasses. L'huile est constituée essentiellement d'acides gras insaturés. Elle est riche en tocophérols. Son profil acide linoléique/acide oléique est caractéristique [38, 41]. Cette huile est traditionnellement utilisée en cuisine au Tchad, en Tanzanie et en Chine [3]. Elle peut entrer également dans la fabrication de savon et de produits cosmétiques.

Les graines d'*H. sabdariffa* présentent donc un potentiel intéressant comme sources de protéines et de matières grasses. Une meilleure valorisation de cette partie de la plante pourrait contribuer au développement de sa culture.

3.1.3. Feuilles

La composition des feuilles d'*H. sabdariffa* est également propice à leur utilisation dans l'alimentation humaine. Au Sénégal, ces feuilles sont utilisées pour fabriquer une sauce aigre, épaisse, appelée « *békéj* », servie avec le riz au poisson. Au Mali, elles sont bouillies pour fabriquer des sauces accom-

pagnant différents plats à base de tubercules [3, 35].

En dépit de l'abondance de ces produits sur les marchés locaux, la production de feuilles et de calices d'*H. sabdariffa* pour la consommation domestique en Afrique n'aurait encore jamais été quantifiée [62, 63].

3.2. Utilisations médicinales

L'espèce *H. sabdariffa* aurait de nombreuses propriétés thérapeutiques. Elle est utilisée dans la plupart des médecines traditionnelles aussi bien dans les pays du Sud que dans les pays du Nord. Néanmoins, seul un nombre limité de ces propriétés médicinales a fait l'objet d'études cliniques menées pour la majeure partie sur des animaux (*tableau XI*).

Plusieurs de ces propriétés médicinales sont attribuées aux concentrations élevées en acides organiques, notamment en acide malique, ascorbique et acide citrique [88]. D'autres activités biologiques seraient liées aux composés anthocyaniques qui sont dotés d'activités antioxydantes importantes [35, 89].

Deux études cliniques, l'une en Iran et l'autre au Mexique [69], réalisées respectivement sur 54 et 75 patients, ont mis en évidence que la consommation journalière d'extrait d'*H. sabdariffa* diminuerait de manière significative la tension artérielle

Composition et principales utilisations du bissap

chez les sujets hypertendus. Cependant, en dépit de l'utilisation populaire de cette plante dans le domaine de la pharmacologie (*tableau XII*), peu ou pas d'informations ont été fournies jusqu'à présent sur sa toxicité. Des travaux complémentaires seraient donc nécessaires dans ce domaine.

4. Conclusion

Les feuilles et les graines d'*H. sabdariffa*, de par leur richesse en protéines, lipides et éléments minéraux et du fait de leur disponibilité, entrent dans l'alimentation des populations rurales des pays en voie de développement. Les calices rouges sont utilisés dans l'alimentation humaine pour la production de confiture, gelée et surtout de boissons rafraichissantes présentant une couleur rouge attractive et un goût plus ou moins acidulé selon les variétés. La couleur rouge est due à la richesse des calices en anthocyanes qui présenteraient plusieurs intérêts nutritionnels et médicaux. Ces potentialités ont entraîné une augmentation de la demande internationale en calices secs, ce qui constitue une source de revenus importante pour les agriculteurs des pays en voie de développement. Cependant, la relative instabilité des anthocyanes trouvés dans *H. sabdariffa* limite leur utilisation pour l'élaboration de boissons et leur emploi comme colorant naturel que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans d'autres secteurs tels que les industries pharmaceutique et cosmétique.

Des recherches complémentaires sur les propriétés antioxydantes et thérapeutiques de la plante mériteraient d'être menées. L'étude des différents mécanismes de dégradation des anthocyanes d'*H. sabdariffa* doit être envisagée en tenant compte de plusieurs facteurs tels que la composition des extraits, les températures de traitement, la teneur en oxygène dissous ou l'exposition à la lumière. Enfin, pour obtenir des calices d'*H. sabdariffa* de qualités physico-chimique et nutritionnelle optimales, il serait essentiel d'améliorer l'organisation des filières de production et de rechercher les meilleures conditions et techniques de culture.

Remerciements

Ce travail bibliographique s'intègre dans le cadre du projet « Couplage de procédés membranaires pour la production d'extraits anthocyaniques : application à *Hibiscus sabdariffa* » qui bénéficie d'un support financier du réseau des chercheurs en Génie des Procédés Appliqués à l'Agroalimentaire (GP3A) de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

Références

- [1] Kerharo J., Adam J.G., La pharmacopée sénégalaise traditionnelle – Plantes médicinales et toxiques, Vigot Frères, Paris, France, 1974.
- [2] Morton J.F., Roselle, in: Dowling C.F. (Ed.), Fruits of warm climates, Media, Inc., Greenborough, USA, 1987, pp. 281–286.
- [3] McClintock N.C., El Tahir I.M., *Hibiscus sabdariffa* L., in: Grubben G.J.H., Denton, O.A. (Ed.), PROTA 2 (Plant Resources of Tropical Africa): vegetables [CD-Rom], PROTA, Wageningen, Neth., 2004.
- [4] Cisse M., Dornier M., Sakho M., Mar Diop C., Reynes, M., Sock O., La production de bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au Sénégal, Fruits 64 (1) (2009) 1–14.
- [5] D'Heureux-Calix F., Badrie N., Consumer acceptance and physicochemical quality of processed red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sauces from enzymatic extracted calyces, Food Serv. Technol. 4 (2004) 141–148.
- [6] Wong P.K., Yusof S., Ghazali H.M., Che Man Y.B., Physicochemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), Nutr. Food Sci. 32 (2002) 68–73.
- [7] Babalola S.O., Babalola A.O., Aworh O.C., Compositional attributes of the calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa*), J. Food Technol. Afr. 6 (4) (2001) 133–134.
- [8] Bloomfield N., Preparation of sorrel ketchup from the red calyces of the roselle fruit (*H. sabdariffa*), Res. Proj. Rep., Food Sci. Technol. Unit, Fac. Eng., Univ. West Indies, St. Augustine, Trinidad Tobago, 1976.
- [9] Dafallah A.A., al-Mustafa Z., Investigation of the anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*, Am. J. Chin. Med. 24 (1) (1996) 263–269.

M. Cisse *et al.*

- [10] Maiga A., Diallo D., Bye R., Paulsen B.S., Determination of some toxic and essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2316–2321.
- [11] Lukaski H. C., Vitamin and mineral status: effects on physical performance, *Nutr.* 20 (2004) 632–644.
- [12] Haider S., Naithani V., Barthawal J., Kakkar P., Heavy metal content in some therapeutically important medicinal plants, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72 (2004) 119–127.
- [13] Bahemuka T.E., Mubofu E.B., Heavy metals in edible green vegetables grown along the sites of the Sinza and Msimbazi rivers in Dar-Es-Salaam, Tanzania, *Food Chem.* 66 (1999) 63–66.
- [14] Tsai P.J., Studies on the color deterioration of roselles during post harvest handling, drying and storage, *Natl. Chung Hsing Univ., Ph. D diss., Taiwan*, 1995.
- [15] Chen S.H., Huang T.C., Ho C.T., Tsai P.J., Extraction, analysis, and study on the volatiles in roselle tea, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1101–1105.
- [16] Forsyth W.G.C., Simmonds N.W., A survey of anthocyanins of some tropical plants, *Proc. R. Soc.* 142 (1954) 549–553.
- [17] El-Adawy T.A., Khalil A.H., Characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1896–1900.
- [18] Al-Wandawi H., Al-Shaikly K., Abdulrahman M., Roselle seeds: a new protein source, *J. Agric. Food Chem.* 32 (1984) 510–512.
- [19] Mazza G., Miniati E., Anthocyanin in fruits, vegetables and grains, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2000.
- [20] Du C.T., Francis F.J., Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), *J. Food Sci.* 38 (1973) 810–812.
- [21] Pouget M.P., Vennat B., Lejeune B., Pourrat A., Extraction analysis and study of the stability of *Hibiscus* anthocyanins, *Lebensm.-Wiss. Technol.* 23 (1990) 103–105.
- [22] Bridle P., Timberlake C.F., Anthocyanins as natural food colours selected aspects, *Food Chem.* 58 (1997) 103–109.
- [23] Degenhardt A., Knapp H., Winterhalter P., Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 338–343.
- [24] Kahkonen M.P., Heinonen M., Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 628–633.
- [25] Lazze M.C., Pizzala R., Savio M., Stivala L.A., Prosperi E., Bianchi L., Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells, *Mutat. Res.* 535 (2003) 103–115.
- [26] Palé É., Kouda-Bonafos M., Nacro M., Caractérisation et mesure des activités anti-radicales d'anthocyanes de plantes du Burkina Faso, *C. R. Chimie* 7 (2004) 973–980.
- [27] Francis F.J., Colour analysis, in: Nielsen N.N., *Food Analysis*, Aspen Publ., Gaithersburg, MD, USA, 1990, pp. 599–612.
- [28] Wang C.J., Wang J.M., Lin W.L., Chu C.Y., Chou F.P., Tseng T.H., Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 411–416.
- [29] Herrera-Arellano A., Flores-Romero S., Chavez-Sotoc M., Tortoriello J., Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial, *Phytomed.* 11 (2004) 375–382.
- [30] Dickel M.L., Rates S.M.K., Ritter M.R., Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil, *J. Ethnopharmacol.* 109 (2007) 60–71.
- [31] Tsai P.J., McIntosh J., Pearce P., Camden B., Jordan B.R., Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract, *Food Res. Int.* 35 (2002) 351–356.
- [32] Chen H.H., Tsai P.J., Chen S.H., Su Y.M., Chung C.C., Huang T.C., Grey relational analysis of dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), *J. Food Process. Preserv.* 29 (2005) 228–245.
- [33] Esselen W.B., Sammy G.M., Applications for roselle as a red food colorant, *Food Prod. Dev.* 9 (1975) 34–40.
- [34] Tsai P.J., Ou A.S.M., Colour degradation of dried roselle during storage, *Food Sci.* 23 (1996) 629–640.
- [35] Sarni-Manchad P., Cheynier V., Les polyphénols en agroalimentaire, *Éd Tec & Doc., Coll. Sci. & Techn. Agroaliment., Lavoisier, Paris*, 2006, 398 p.

Composition et principales utilisations du bissap

- [36] Omobuwajo T.O., Sanni L.A., Balami Y.A., Physical properties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) seeds, J. Food Eng. 45 (2000) 37–41.
- [37] Oje K., Ugbor E.C., Some physical properties of oil bean seed, J. Agric. Eng. Res. 50 (1991) 305–313.
- [38] Lazos E.S., Tsaknis J., Lalas S., Characteristics and composition of tomato seed oil, Grasas Aceites 49 (1998) 440–445.
- [39] Diop A.G., Sakho M., Dornier M., Cisse M., Reynes M., Le baobab africain (*Adansonia digitata* L.) : principales caractéristiques et utilisations, Fruits 61 (1) (2005) 55–69.
- [40] Glew R.H., Vanderjagt D.J., Lockett C., Grivetti L.E., Smith G.C., Pastuszyn A., Millson M., Amino acid, fatty acid, and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina Faso, J. Food Compos. Anal. 10 (1997) 205–217.
- [41] Mohamed R., Fernandez J., Pineda M., Aguilar M., Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of γ -tocopherol, J. Food Sci. 72 (3) (2007) 207–211.
- [42] Abu-Tarboush H.M., Ahmed, S.B., Al Khatani H.A., Some nutritional and functional properties of karkade (*Hibiscus sabdariffa*) seed products, Cereal Chem. 74 (1997) 352–355.
- [43] Swern D., Bailey's industrial oil and fat products, John Wiley & Sons, Vols. 1 & 2, N. Y., USA, 1979.
- [44] Lewis M.J., Physical properties of foods and food processing systems, Ellis Horwood, London, UK, 1987.
- [45] Uceda M., Hermoso M., La calidad del aceite de oliva, in: Barranco D., Fernandez-Escobar R., Rallo L. (Eds.), El cultivo del olivo, Ed. Mundi Prensa, Madrid, Spain, 2001.
- [46] Oomah B.D., Ladet S., Godfrey D.V., Liang J., Girard B., Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil, Food Chem. 69 (2000) 187–193.
- [47] Jirovetz L., Jaeger W., Remberg G., Espinosa-Gonzalez J., Morales R., Woidich A., Nikiforov A., Analysis of the volatiles in the seed oil of *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) by means of GC-MS and GC-FTIR, J. Agric. Food Chem. 40 (1992) 1186–1187.
- [48] Leung W., Busson F., Jardin C., Food composition table for use in Africa, FAO, Rome, Italy, 1968, 306 p.
- [49] Diouf M., Lô C., Gueye M., Mbengue N.B., Sélection participative de nouveaux cultivars de quatre (4) espèces de légumes feuilles (*Hibiscus sabdariffa* L., *Amaranthus* L. spp., *Vigna unguiculata* (L.) Walp et *Moringa oleifera* Lam) au Sénégal, Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev. 7 (3) (2007).
- [50] Attere F., Note introductive de l'atelier sur les légumes feuilles traditionnels, in: Chweya J.A., Eyzaguirre P. (Eds.), Biodiversity of traditional leafy vegetables in Africa, Int. Plant Genet. Res. Inst. (IPGRI), Rome, Italie, 1999.
- [51] Kahane R., Temple L., Brat P., De Bon H., Les légumes feuilles dans les pays tropicaux : diversité, richesse économique et valeur santé dans un contexte très fragile, in : Les légumes : un patrimoine à transmettre et à valoriser, colloq. AFCEV-BRG-INH, 7–9 Sept. 2005, Angers, France.
- [52] Mounigan P., Badrie N., Physicochemical and sensory quality of wines from red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces: effects of pretreatments of pectolase and temperature/time, Int. J. Food Sci. Technol. 42 (2007) 469–475.
- [53] Ojokoh A.O., Adetuyi F.C., Akinyosoye F.A., Oyetayo V.O., Fermentation studies on roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces neutralised with trona, J. Food Technol. Afr. 7 (3) (2002) 75–78.
- [54] Ouedraogo J., Vinaigre d'oseille, SYFIA 99, 1997.
- [55] Odunfa S.A., Microorganisms associated with fermentation of African locust bean (*Parkia filicoidea*) during 'iru' preparation, J. Plant Foods 3 (1981) 245–250.
- [56] Dashak D.A., Dawang M.L., Lucas N.B., An assessment of the proximate chemical composition of locally produced spices known as dadawa basso and dadawa kalwa from three markets in Plateau State of Nigeria, Food Chem. 75 (2001) 231–235.
- [57] Beaumont M., Flavouring composition prepared by fermentation with *Bacillus* spp., Int. J. Food Microbiol. 75 (2002) 189–196.
- [58] Yagoub A.A., Mohamed E.B., Ahmed A.H.R., El Tinay A.E., Study on furundu, a traditional Sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: effect on *in vitro* protein digestibility, chemical composition, and functional properties of the total proteins, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 6143–6150.
- [59] Diawara B., Sawadogo L., Amoa-Awua W.K.A., Jakobsen M., Quality system for the production of soumbala, The HACCP System, Waitro, Dan. Technol. Inst., Taastrup, Dan., 1998.

M. Cisse *et al.*

- [60] N'Dir B., Hbid C., Cornelius C., Roblain D., Jacques P., Vanhentenryck F., Diop M., Thonart P., Propriétés antifongiques de la microflore sporulée du nêtêtu, *Cah. Agric.* 3 (1994) 23–30.
- [61] Wang J., Fung Y.C., Alkaline-fermented foods. A review with emphasis on Pidan fermentation, *Crit. Rev. Microbiol.* 22 (2) (1996) 101–138.
- [62] Babatunde F.E., Intercrop productivity of roselle in Nigeria, *Afr. Crop Sci. J.* 11 (2003) 1–6.
- [63] Diouf M., Diop M., Lô C., Drame K.A., Sene E., Ba C.O., Gueye M., Faye B., Prospection de légumes feuilles traditionnels de type africain au Sénégal, in: Chweya J.A., Eyzaguiere P. (Eds.), *Biodiversity of traditional leafy vegetables in Africa*, Int. Plant Genet. Res. Inst. (IPGRI), Rome, Italy, 1999, pp. 111–150.
- [64] Ajay M., Achike F.I., Mustafa A.M., Mustafa M.R., Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae. Comparative study with ascorbic acid, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33 (2006) 345–350.
- [65] Ajay M., Chai H.J., Mustafa A.M., Gilani A.H., Mustafa M.R., Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces, *J. Ethnopharmacol.* 109 (2007) 388–393.
- [66] Kirdpon S., Nakorn S.N., Kirdpon W., Changes in urinary chemical composition in healthy volunteers after consuming roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) juice, *J. Med. Assoc. Thail.* 77 (1994) 314–321.
- [67] Haji F.M., Haji T.A., The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension, *J. Ethnopharmacol.* 65 (1999) 231–236.
- [68] Odigie I.P., Ettarh R.R., Adigun S.A., Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats, *J. Ethnopharmacol.* 86 (2003) 181–185.
- [69] Hirunpanich V., Utaipat A., Morales N.P., Bunyaphatsara N., Sato H., Herunsale A., Suthisisang C., Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats, *J. Ethnopharmacol.* 103 (2006) 252–260.
- [70] Onyenekwe P.C., Ajani E.O., Ameh D.A., Gamaniel K.S., Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats, *Cell Biochem. Funct.* 17 (1999) 199–206.
- [71] Suboh S.M., Bilito Y.Y., Aburjai T.A., Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes, *Phytother. Res.* 18 (2004) 280–284.
- [72] Ali B.H., Mousa H.M., El-Mougy S., The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats, *Phytother. Res.* 17 (1) (2003) 56–59.
- [73] Christiana K.R., Nairb M.G., Jackson J.C., Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*), *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 778–783.
- [74] Chen C.C., Hsu J.D., Wang S.F., Chiang H.C., Yang M.Y., Kao E.S., Ho Y.C., Wang C.J., *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5472–5477.
- [75] Prenesti E., Berto S., Daniele P.G., Toso S., Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers, *Food Chem.* 100 (2007) 433–438.
- [76] Lin W.L., Hsieh Y.J., Chou F.P., Wang, C.J., Cheng M.T., Tseng T.H., *Hibiscus* protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage, *Arch. Toxicol.* 77 (2003) 42–47.
- [77] Wang C.J., Wang J.M., Lin W.L., Chu C.Y., Chou F.P., Tseng T.H., Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 411–416.
- [78] Amin A., Hamza A.A., Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats, *Life Sci.* 77 (2005) 266–278.
- [79] Falade O.S., Otemuyiwa I.O., Oladipo A., Oyedapoc O.O., Akinpelu B.A., Adewusi S.R.A., The chemical composition and membrane stability activity of some herbs used in local therapy for anaemia, *J. Ethnopharmacol.* 102 (2005) 15–22.
- [80] Mounnissamy V.M., Gunasegaran R., Gopal V., Saraswathy A., Diuretic activity of gossypetin isolated from *Hibiscus sabdariffa* in rats, *Hamdard Medicus* 45 (2) (2002) 68–70.

Composition et principales utilisations du bissap

- [81] Tseng T.H., Hsu J.D., Lo M.H., Chu C.Y., Chou F.P., Huang C.L., Wang C.J., Inhibitory effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin, *Cancer Lett.* 126 (1998) 199–207.
- [82] Lin L.T., Liu L.T., Chiang L.C., Lin C.C., *In vitro* antihepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada, *J. Sci. Food Agric.* 16 (2002) 440–444.
- [83] Chen C.C., Chou F.P., Ho Y.C., Lin W.L., Kao E.S., Huang A.C., Wang C.J., Inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* L. extract on low-density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats, *J. Sci. Food Agric.* 84 (2004) 1989–1996.
- [84] Chang Y.C., Huang K.X., Huang A.C., Ho Y.C., Wang C.J., *Hibiscus* anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 1015–1023.
- [85] Garcia V.M.N., Rojas G., Zepeda L.G., Aviles M., Fuentes M., Herrera A., Enrique Jiménez E., Antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants, *Pharm. Biol.* 44 (4) (2006) 297–300.
- [86] Liu J.Y., Chen C.C., Wang W.H., Hsu J.D., Yang M.Y., Wang C.J., The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl₄-induced liver fibrosis in rats, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 336–343.
- [87] Akindahunsi A.A., Olaleye M.T., Toxicological investigation of aqueous-methanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L., *J. Ethnopharmacol.* 89 (2003) 161–164.
- [88] Kohen J.L., Downing A.J., Aboriginal use of plants on the western Cumberland Plain Sydney Basin, *Naturalist* 1 (1992) 1–6.

El bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composición y principales utilizaciones.

Resumen — Introduction. *Hibiscus sabdariffa* L. es una planta herbácea, que se encuentra en gran parte en áreas tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. *H. sabdariffa* es utilizado por sus fibras, y principalmente por sus cálices que son de tres tipos: verde, rojo y rojo oscuro.

Composición. Los cálices tipo rojo son los más utilizados y se caracterizan por su alta concentración de antocianinas, que puede llegar a 1,5 g·kg⁻¹. El delphinidine 3-sambubioside y cyanidine 3-sambubioside antocianinas son la mayoría, respectivamente con (71 y el 29) % del total de antocianinas. Los ácidos orgánicos, minerales y aminoácidos están presentes en los cálices, hojas y semillas de *H. sabdariffa* a los niveles varían dependiendo de la variedad y zona geográfica.

Usos. El uso de diferentes partes del *H. sabdariffa* son muchas y variadas, tanto en los alimentos que en la medicina tradicional. Los cálices, debido a su alta concentración de ácido, vitamina C y especialmente en antocianinas son parte de la planta más utilizada. Ellos son utilizados principalmente para la producción de bebidas refrescante y tónico sin alcohol. Las semillas de *H. sabdariffa* por su riqueza en proteínas (26 %), grasa (20 %) y azúcares totales (40 %) son ampliamente utilizados en la dieta de muchos países africanos. Las hojas son una buena fuente de nutrientes y se utilizan en África en la preparación de salsas.

Senegal / *Hibiscus sabdariffa* / cáliz / hojas / semilla / antocianinas / composición aproximada / usos

3-Extraction solide-liquide de molécules actives

L'extraction solide-liquide constitue la première opération de séparation de plusieurs filières de transformations (extraits de fruits, boissons alcoolisées, sucrerie, etc.). Elle constitue la charnière au niveau de laquelle, les industries alimentaires prennent le relais du domaine agricole.

Cette opération est très ancienne. Elle est largement utilisée en industrie agro-alimentaire pour extraire des plantes des composés alimentaires ou pharmaceutiques, en vue par exemple de la production de boisson ou de médicament.

3-1- Définition

L'extraction solide-liquide, encore appelé extraction par solvant est une opération de transfert de matière destinée à séparer les principes solubles d'un substrat solide par leur diffusion dans un solvant. Son but est d'extraire, de séparer ou de dissoudre par immersion dans un liquide ou par arrosage par un liquide, un ou plusieurs composants mélangés à un solide. La diffusion est réalisée grâce à l'existence d'un gradient de concentration en soluté à extraire entre la phase solide et la phase liquide. A la fin de l'opération, le système tend vers l'équilibre. Il s'agit normalement d'une opération à pression constante.

Dans la plupart des cas, la solution, encore appelé extrait, constitue la phase noble (extrait anthocyanique d'*Hibiscus sabdariffa*) tandis que la phase insoluble constitue le résidu encore appelé raffinat (calices d'*Hibiscus sabdariffa* sans anthocyane). Toutefois, dans certains cas, le résidu solide insoluble est le produit recherché (thé ou café sans caféine) (8).

L'extraction solide-liquide se présente sous plusieurs variantes (percolation, décoction, infusion et macération) avec comme dénominateur commun de faire interagir le solvant sur le matériau solide pour dissoudre ses composés solubles. Le **tableau 1** compare les différentes méthodes d'extraction solide-liquide.

Tableau 1. Comparaison des différentes méthodes d'extraction solide-liquide

Méthodes	Principe	Température/temps	Exemple de produits	Références
Percolation	Écoulement d'un solvant à travers un solide poreux plus ou moins divisé	≈ 100 °C / quelques secondes ou minutes	Café, thé	(9, 10)
Décoction	Extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans l'eau bouillante	≈ 100 °C / quelques minutes	Racine, graine, feuille	(11, 12)
Infusion	Extraction de principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir	25-100 °C/ quelques minutes	Tisane, thé Composés pharmaceutiques et parfums	(13-16)
Macération	Trempage d'un solide dans un solvant	Température ambiante / quelques heures à plusieurs mois	Végétaux, viande, poisson	(17, 18)
Élution	Enlever un soluté fixé à la surface d'un solide par contact avec un solvant	Température ambiante	Polyphénols	(19)

3-2- Mécanismes de l'extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est généralement réalisée par contact intime entre le solide et le solvant et séparation mécanique de la solution et du solide. Les mécanismes d'extraction varient selon la nature du produit traité. Schématiquement, l'extraction va se dérouler en quatre grandes phases : la diffusion du solvant dans la matrice solide, le passage du soluté dans le solvant, le lavage du solide par du solvant frais ou pauvre en soluté et la séparation mécanique du solide et de la solution contenant les solutés.

Dans la plupart des végétaux, le transfert du solvant à travers la matrice solide peut être une étape limitante. En effet, la structure des végétaux génère une mauvaise aptitude quant à la diffusion interne des liquides. Le transfert du soluté dans le liquide est l'extraction solide-liquide proprement dit. Il est régi par trois processus élémentaires de l'échange de matière à savoir : la dissolution du soluté au sein des particules par le solvant, la diffusion de la solution vers l'extérieur de la particule et le transfert du soluté contenu dans la solution au contact du solide vers la masse restante du solvant par convection ou diffusion.

Le passage du soluté de la solution au contact du solide vers le reste de solvant peut être considéré comme une simple opération de mélange. La diffusion du liquide vers la surface extérieure du solide est décrite à travers la théorie des films (couche limite). En effet, c'est la résistance opposée par le film mince entourant le ou les particules solides qui détermine la vitesse de diffusion c'est-à-dire la vitesse de transfert ou vitesse d'extraction. Une relation étroite existe entre la vitesse d'extraction, la couche limite et la structure de la matière. Ainsi pour mieux appréhender ces aspects, nous allons aborder quelques éléments théoriques de l'extraction solide-liquide.

3-3- Cinétiques de l'extraction solide-liquide : cas d'une opération en batch

3-3-1- Hypothèses de calcul

Les hypothèses simplificatrices suivantes sont posées :

- la diffusion du solvant dans la matrice solide étant effective, on se trouve dans la phase de diffusion ;
- le coefficient de partage du soluté entre le solvant et la matrice solide est égale à un ;
- la perte de masse de la phase solide consécutive à la diffusion de soluté est compensée par le gain de poids de la phase solide consécutive à la migration du solvant ;
- la matrice solide est suffisamment divisée pour que l'on puisse négliger les gradients internes de concentration en soluté.

3-3-2- Cinétiques de l'extraction

L'ensemble soluté et solvant (suspension) étant plus ou moins agité, le soluté passe de la couche limite au solvant par convection. La variation de concentration de la phase solide en soluté est proportionnelle à sa variation de masse et peut être exprimée par l'équation 1.

$$\frac{dC}{dt} = -k(C - C') \quad (1)$$

où C est la concentration de phase solide en soluté, C' concentration de la phase liquide en soluté, k coefficient de transfert. Si m est la masse totale de suspension, m' la masse de la phase solide rapportée à la masse totale de la suspension et C_0 la concentration initiale du soluté dans la phase solide, l'équation 2 donne le bilan matière.

$$m'mC_0 = m'mC + (1 - m')mC' \quad (2)$$

En simplifiant l'équation 2, on obtient :

$$C' = \frac{m'(C_0 - C)}{1 - m'} \quad (3)$$

En combinant les équations 1, 2 et 3 on obtient l'équation 4.

$$C = m'C_0(1 - e^{-\frac{k}{1-m'}t}) \quad (4)$$

Souvent vérifiée expérimentalement, l'équation 4 peut être écrite sous une forme condensée (équation 5).

$$C' = C_\infty (1 - e^{-\lambda t}) \quad (5)$$

où C_∞ est la concentration en soluté dans le solvant à t_∞ . A travers l'équation 5 on peut déduire qu'il y a une influence de la durée d'extraction sur les performances de l'opération d'extraction solide-liquide d'une part. D'autre part, le rendement d'extraction R est donné par la formule suivante :

$$R = \frac{(1-m')C'}{m'C_0} = (1 - m').(1 - e^{-\frac{k}{1-m'}t}) \quad (6)$$

On constate que R tend vers $1 - m'$ quand t tend vers ∞ . Le fait que le rendement d'extraction théorique admette une limite d'autant plus basse que l'extracteur est plus chargé en phase solide, montre l'un des inconvénients d'une opération en batch. Une augmentation de la masse m' est favorable à l'extraction car une concentration plus élevée de l'extract se traduit par une augmentation de la quantité de soluté extraite. Cependant, le rendement

d'extraction va sensiblement diminuer. Un compromis doit donc être trouvé entre un extrait suffisamment concentré et un rendement d'extraction élevé.

Ce compromis constitue le cœur de l'étude consacrée à l'optimisation de l'extraction aqueuse des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* au niveau de la publication n° 5 dans la partie résultats et discussion de cette thèse.

3-4- Facteurs influençant les performances de l'extraction solide-liquide

Plusieurs facteurs interviennent de manière plus ou moins significative sur les performances de l'extraction à savoir la vitesse d'extraction, la concentration de l'extrait et le rendement d'extraction. Ces facteurs sont liés par exemple à l'état du solide et du soluté, à la nature du solvant ou encore au degré d'agitation des phases.

3-4-1- Nature et état du solide et du soluté

La nature et l'état physique du solide déterminent le mécanisme de transfert de matière. Les solides à traiter se présentent soit sous forme de particules compactes de diverses tailles soit sous forme de fines particules. En règle générale, il est souhaitable de travailler sur des petites particules. En effet, plus la matière est divisée et plus la surface d'échange est grande. Les échanges osmotiques seront alors plus importants et le parcours moyen du soluté sera plus petit. C'est pourquoi, dans la pratique, pour augmenter les performances de l'extraction, une extraction est généralement précédée d'une opération mécanique telle que le découpage ou le broyage. Ainsi, des rendements d'extraction en composés phénoliques et notamment en anthocyane élevés ont été notés lors de la diminution des tailles de particules dans le cas du marc de raisin (20) et du tournesol (21).

Cependant des particules trop fines risquent de rendre difficile l'opération de séparation solide-liquide qui suit celle de l'extraction. La séparation de l'extrait et du résidu insoluble est d'autant plus difficile, quelle que soit la technique employée, que la taille des particules à séparer est réduite. La teneur en soluté et sa distribution dans le solide constituent aussi des éléments influençant les performances de l'extraction solide-liquide (22).

3-4-2- Nature du solvant et pH

Le choix du solvant d'extraction est fonction de ses propriétés physiques, de la nature des solutés à extraire et de son coût. Le solvant doit être sélectif, posséder une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée, une viscosité faible. Il doit être non toxique, ininflammable et non explosif, disponible et peu coûteux. Pour ces nombreuses raisons, l'eau, l'éthanol et l'hexane sont les solvants les plus utilisés dans les industries agro-alimentaires.

Pour la plupart des solvants, le pH intervient au niveau de la dissolution des composés solubles. Pour l'eau, il peut jouer un rôle dans la solubilisation de la fraction hydrolysable. Il agit également sur les hydrolyses chimiques et enzymatiques. Enfin, le pH peut être mis à profit pour apporter à l'extraction une certaine sélectivité. Dans le cas de l'extraction des anthocyanes de la carotte noire, une augmentation du pH se traduit par une diminution du coefficient de diffusion efficace de 3,73 à 0,18 m².s⁻¹ lorsque le pH passe de 2 à 4 à une température d'extraction de 25°C (23).

Depuis quelques années, des fluides à l'état supercritique sont de plus en plus utilisés comme solvant d'extraction. C'est le cas par exemple, lors de l'extraction de phytostérol contenu dans les graines d'*Hibiscus sabdariffa* par extraction au CO₂ supercritique (24).

3-4-3- Température

L'influence de la température sur les performances de l'opération n'est pas facile à évaluer car elle agit sur tous les phénomènes intervenant dans l'extraction. D'une manière générale et de façon simpliste, l'élévation de la température permet généralement l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité de la solution.

Ainsi, plusieurs travaux ont montré l'effet positif d'une augmentation de la température sur les performances de l'extraction solide-liquide des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* (25, 26), des anthocyanes de la carotte noire (23, 27), des composés phénoliques de la fraise et du marc de raisin (28, 29). Cependant l'augmentation de la température d'extraction est limitée par les risques d'extraire des composés indésirables (8, 22), par les risques de dégradation thermique et par les risques de formation de composés nuisibles à la qualité de l'extrait tels que les mélanoïdines par l'intermédiaire des réactions de brunissement non enzymatique, les hydroxyles méthyle furfurals via la dégradation acide des hexoses.

3-4-4- Niveau d'agitation

L'agitation mécanique des particules dans le solvant a un effet favorable sur les performances de l'extraction solide-liquide. En effet, une agitation suffisante permet de maintenir en suspension les particules et d'assurer l'homogénéisation du milieu. Elle permet également de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de la couche limite et d'augmenter ainsi le coefficient de transfert. La vitesse d'agitation sera donc fonction de la taille et de la masse du solide contenant les solutés à extraire. Dans le cas de l'extraction des produits végétaux, une agitation continue favorise les chocs entre les différentes particules. Ceci va provoquer l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer alors leur contenu cellulaire dans le solvant (22).

3-4-5- Concentration résiduaire en soluté

La vitesse d'extraction est inversement proportionnelle au taux de saturation du solvant (22) τ défini par l'équation 7.

$$\tau = \frac{Y}{Y_s} (1 - \exp \left[-\frac{Da}{\delta V} t \right]) \quad (7)$$

avec, Y concentration en soluté de la solution à l'instant t , Y_s concentration en soluté de la solution saturée au contact des particules, D coefficient de diffusion ou diffusivité du soluté, a aire interfaciale par unité de volume, δ épaisseur du film à l'interface des particules et V volume total de solution.

3-5- Performances de l'extraction solide-liquide

L'extraction idéale est caractérisée par un débit élevé, un rendement maximum, une sélectivité adaptée à l'objectif visé et une concentration maximale de l'extrait. Cependant certains de ces facteurs peuvent être antagonistes comme par exemple le rendement et la concentration. Un compromis est à définir dans la pratique.

3-5-1- Débit

Le débit d'extraction peut s'exprimer par la masse d'extrait obtenue par unité de temps. Dans le cas de l'extraction continue, le débit de l'extraction est défini à travers le nombre d'unités de transfert (NUT).

$$NUT = \frac{C_1 - C_2}{\Delta C_m} \quad (8)$$

où, C_1 , C_2 représentent les concentrations du soluté dans la phase solide respectivement à l'entrée et à la sortie de l'extracteur, ΔC_m la différence moyenne logarithmique des concentrations entre l'extrait et la phase solide.

5-2- Rendement

Dans la plupart des milieux (fruits, thé, café), le rendement d'extraction est défini comme le rapport entre la masse d'extrait sec obtenue et la masse d'extrait sec soluble initiale de la phase solide. Dans le cas de l'extraction des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*, il représente la masse d'anthocyane obtenue dans l'extrait par rapport à la masse d'anthocyane initialement présente dans les calices. Il peut être obtenu en utilisant l'équation 9.

$$R_a = \frac{m_{a/e}}{m_{a/c}} = \frac{C_{a/e} m_e}{C_{a/c} m_c} \quad (9)$$

où $m_{a/e}$ et $m_{a/c}$ représentent respectivement les masses d'anthocyane dans l'extrait et dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa*, $C_{a/e}$ et $C_{a/c}$ sont respectivement les concentrations en anthocyane dans l'extrait et dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa* et m_e et m_c correspondent respectivement aux masses d'extraits et de calices.

Dans le cas de procédés d'extraction en continu, le rendement peut être complété par la productivité en rapportant la masse d'extrait obtenue au temps de séjour de la phase solide dans l'extracteur et au volume utile de l'extracteur. Ce critère peut être alors utilisé pour comparer plusieurs modalités d'extraction. Ainsi, des rendements similaires ont été observés lors de l'extraction en batch ou en continu de pectine à partir de tournesol, mais avec une nette différence de productivité en faveur de l'extraction continue (30).

5-3- Sélectivité

Deux cas de figure peuvent se présenter. Dans le premier cas, l'objectif de sélectivité se réduit à la non extraction des composés indésirables. Dans d'autres cas, on cherchera à extraire sélectivement un seul composé ou une fraction bien définie. La sélectivité de l'extraction est le plus souvent caractérisée par la teneur de l'extrait en composé désiré rapportée à son extrait sec total, ce qui correspond en fait à la pureté de l'extrait.

Par exemple, dans notre cas on cherchera à extraire le maximum de composés polyphénoliques, notamment d'anthocyanes, et en même temps à limiter l'extraction des pectines présentes dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Une concentration importante en pectines pourrait avoir pour conséquence une augmentation de la viscosité, voire la gélification des concentrés.

3-5-4- Concentration de l'extrait

L'extrait obtenu après extraction subit généralement d'autres opérations telles que la concentration, le séchage, etc. Il est donc important d'avoir un extrait aussi concentré que possible. En effet, la consommation énergétique des procédés de concentration qui suivent l'étape d'extraction sera d'autant plus importante que l'extrait sera plus dilué.

4-Les procédés baromembranaires

L'utilisation des membranes dans l'industrie agro-alimentaire a pris une expansion considérable depuis une trentaine d'année. Les marchés pour les procédés membranaires sont loin d'être limités et croissent rapidement (31). Leur taux de croissance se situe entre 7 et 10 % par an (32).

Les procédés membranaires utilisent la séparation d'un ou plusieurs composés en mélange par passage sélectif (perméation) à travers une membrane. La fraction passant à travers la membrane est appelée perméat et celle retenue par la membrane est appelée rétentat. Trois principaux mécanismes régissent les séparations des espèces dans les procédés membranaires. Il s'agit de l'exclusion stérique ou électrostatique, la diffusion de Knudsen et la solubilisation/diffusion. Dans le cas de l'exclusion stérique, les pores de la membrane ont des tailles telles que certaines espèces peuvent passer à travers et d'autres, non. Le passage sélectif à travers des pores dont le diamètre est proche des tailles moléculaires peut être décrit par la diffusion de Knudsen, phénomène observé dans la séparation de gaz. La dissolution dans la membrane, la migration à travers la membrane sous l'effet de la diffusion moléculaire et la réémergence du côté opposé constituent le troisième type de transfert appelé solubilisation/diffusion.

Microfiltration tangentielle (MFT), ultrafiltration (UF) et nanofiltration (NF) peuvent être définies comme des procédés de séparation en phase liquide par perméation à travers des membranes poreuses permselectives sous l'action d'un gradient de pression. La vitesse de passage du liquide à traiter est parallèle à la membrane (flux tangentiel). Dérivée de la technologie de l'ultrafiltration, la microfiltration tangentielle s'est développée au cours des années 1980 et suscite un regain d'intérêt depuis que l'utilisation des adjuvants de filtration classiques tend à être remis en cause en raison de leur caractère polluant. La MFT se distingue de l'ultrafiltration et de la nanofiltration par la taille plus importante des constituants retenus, une pression de travail généralement plus faible ($\Delta P < 3$ bar) et des flux de filtration souvent plus importants. La nanofiltration est une technique relativement nouvelle. En terme de séparation, elle se situe entre l'osmose inverse et l'ultrafiltration. Le **tableau 2** donne quelques éléments caractéristiques de ces trois procédés membranaires

Après quelques généralités sur les techniques membranaires, nous proposons quelques éléments spécifiques qui caractérisent chacun des procédés baromembranaires cités ci-dessus.

Tableau 2. Quelques caractéristiques des procédés baromembranaires

Procédés membranaires	Mécanisme de séparation prépondérant	Taille des pores (nm)	Gamme de pression (bar)	Expressions des densités de flux		Régime de transport
				J_{solvant}	$J_{\text{soluté}}$	
Microfiltration	Exclusion stérique Convection en milieu poreux	100 - 5000	0,5 - 3	$K \frac{\Delta P}{\Delta x}$	$(1 - TR)CJ$	Poiseuille (convectif)
Ultrafiltration	Exclusion stérique Convection en milieu poreux	2 - 100	1 - 10			
Nanofiltration	Exclusion stérique Solubilisation / diffusion Interaction électrostatiques	< 2	5 - 30	$K \frac{\Delta P - \sigma \Delta \pi}{\Delta x}$	$k' \Delta C + (1 - \sigma)CJ$	Poiseuille / Diffusionnel

K : coefficient global de transfert, ΔP : pression transmembranaire, Δx : épaisseur du milieu poreux ; σ : coefficient de rejet ; $\Delta \pi$: pression osmotique ; TR : taux de rétention, ΔC : gradient de concentration du soluté à travers la membrane, C : concentration du soluté, k' coefficient de diffusion

4-1- Généralités sur les procédés baromembranaires

4-1-1- Caractéristiques des membranes

Les caractéristiques des membranes découlent de leur utilisation. Elles doivent répondre à trois catégories d'exigences : l'efficacité de séparation, un flux élevé et une bonne résistance. L'efficacité de la séparation est fonction du seuil de coupure de la membrane qui doit être bien défini d'où un diamètre de pores parfaitement connu et homogène. Une diminution des pertes de charge par augmentation de la porosité et diminution de l'épaisseur de la membrane permet d'obtenir un débit de perméation élevé. La membrane doit présenter une résistance mécanique, chimique et thermique élevée. Ceci permettra un nettoyage efficace, économique et simple et même, si nécessaire, d'effectuer une stérilisation à chaud sans altération de la membrane.

De nombreuses membranes présentent une structure asymétriques (31, 33). Elles sont constituées d'une mince couche active (couche filtrante) déposée sur un support. On parle de membranes composites si la couche filtrante n'est pas de même nature que le support.

Les membranes peuvent être caractérisées par leur porosité, l'épaisseur de la couche filtrante et le diamètre moyen de leurs pores. Le diamètre moyen des pores et leur répartition sont des paramètres essentiels au bon fonctionnement de la membrane. En vue de leur utilisation, les membranes sont disposées dans des modules qui constituent les éléments de base des installations de tout procédé membranaire. La nature des modules, leur assemblage et leur mode d'alimentation est évidemment déterminant.

4-1-2- Mise en œuvre des procédés membranaires

4-1-2-1- Géométrie des modules

La mise en œuvre des membranes dans un module doit répondre à un certain nombre d'exigences techniques, parfois contradictoires. Ces exigences sont l'écoulement du fluide, la surface spécifique d'échange, l'investissement et l'entretien.

Des conditions adéquates d'écoulement, notamment le long des interfaces membranaires, doivent permettre de réduire les couches limites à leur minimum. Le rapport aire des membranes sur volume du module ($m^2.m^{-3}$) constitue la surface spécifique d'échange de la membrane. L'investissement minimal comprend le coût de fabrication et la durée de vie des membranes. Enfin, l'entretien de l'installation doit être facile en permettant un nettoyage ou un remplacement des membranes aisé.

L'importance relative de ces quatre impératifs majeurs dépend du procédé et du type de séparation envisagé. Dans la pratique, quatre types de modules sont disponibles : module

plan, spiralé, tubulaire et fibres creuses. Le **tableau 3** résume les avantages et les inconvénients de l'ensemble des géométries décrites ci-dessous.

- **Module plan**

Le module plan consiste en la répétition, à un certain nombre d'exemplaires, d'une cellule comprenant, dans une épaisseur de quelques millimètres les quatre éléments suivants : membrane-zone amont-membrane-zone aval. Les membranes rectangulaires ou en disque, sont disposées parallèlement les unes aux autres, et séparées par des joints et des supports, qui font respectivement office de compartiments amont et aval.

- **Module spiralé**

Ce type de module se présente comme une cellule unique enroulée en spirale autour d'un axe. Celui-ci est creux, perforé et en contact direct avec l'un des compartiments (généralement l'aval), servant ainsi à la collecte du perméat. L'ensemble est introduit dans une enveloppe cylindrique.

- **Module tubulaire**

Les membranes sont obtenues par dépôt à la surface de tubes poreux de petit diamètre (de l'ordre du cm), ou sont directement incorporées au support. Les tubes sont rassemblés en couches concentriques dans un module. D'un investissement plus élevé, cette géométrie permet de faire circuler le produit à grande vitesse, ou de traiter des solutions visqueuses avec des couches limites minimales.

Les modules tubulaires sont les mieux adaptés aux membranes en céramique ou en carbone. Leur surface d'échange est liée au nombre de tubes disposées en parallèle dans un carter destiné à la réception du perméat.

- **Module à fibres creuses**

Les fibres creuses sont de petits cylindres creux d'un diamètre extérieur compris entre 2 mm et 50 μm et d'un diamètre intérieur correspondant compris entre 800 et 25 μm . Leur structure est généralement asymétrique, avec une membrane active externe ou interne.

Tableau 3. Description, avantages et inconvénients des différentes géométries de membrane.

	Tubulaire	Multi-canaux	Spirale	Plans	Fibres creuses
Description	Membranes sous forme de tube jusqu'à 13 mm de diamètre	Monolithe percé de plusieurs canaux	Membranes planes roulées en spirale	Membranes planes	Membrane sous forme de capillaire (tube 50 μm à 2 mm de diamètre)
Matériau	Organique (rares) Minéral (usuelles)	Organique (rares) Minéral (usuelles)	Organique (usuelles) Minéral (non)	Organique (usuelles) Minéral (rare)	Organique (usuelles) Minéral (en développement)
Avantages	Technologie simple Le fluide à traiter peut circuler à l'intérieur ou à l'extérieur des tubes Adaptées pour produits visqueux ou chargés Prétraitement simplifié Nettoyage facile Pressions élevées jusqu'à 80 bar	Meilleure compacité que la tubulaire	Capacité de filtration élevée Faible volume mort Remplacement des membranes facilité et peu onéreux Coût moindre Compact (100-1000 $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$)	Facile à monter et modulable Visualisation du perméat produit par chaque élément Très bien adapté aux applications ne nécessitant pas de forte pression de fonctionnement	Compacité élevée Faible volume mort Faible consommation énergétique Hautes pressions possibles
Inconvénients	Encombrant (10-100 $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$) Consommation énergétique élevée Volume mort élevé Chères	Coût d'investissement relativement important	Sensible au colmatage Difficultés possibles au nettoyage Réservé aux produits peu visqueux Pertes de charges élevées	Encombrant (10-100 $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$) Prétraitement Investissement élevé Nettoyage difficile Volume mort important	Canaux très fins donc fragile Sensible au colmatage Réservé aux produits peu visqueux Coût de remplacement élevé des membranes

4-1-2-2- Insertion et alimentation des modules dans une installation

Une installation industrielle se limite rarement à l'utilisation d'un seul module. Des combinaisons de modules sont nécessaires pour répondre aux exigences du procédé en termes de volume de liquide à traiter et de qualité du produit final. Deux configurations de base peuvent être envisagées pour réaliser des combinaisons dans une installation à plusieurs étages. Il s'agit de systèmes à simple passage ou à recirculation tels que schématisés sur les **figures 1a** et **1b**. Un des modes de fonctionnement utilisé pour des surfaces de membrane de quelques mètres carrés, consiste à travailler à partir d'un système « batch ». La filtration s'y effectue par épuisement d'un réservoir d'alimentation dans lequel le rétentat est recyclé en permanence (**Figure 1c**).

L'étape suivante consiste à disposer en série ou/et en parallèle plusieurs étages de modules afin d'atteindre la surface de membrane requise pour une installation (**Figure 2**). Dans le système à simple passage, la solution d'alimentation passe une seule fois dans chaque module sans recirculation. Ainsi le volume de solution à traiter diminue d'une fraction correspondant au perméat éliminé dans chaque module. Les étages successifs présentent alors des surfaces de membrane de plus en plus faible. Par contre, il se produit une importante chute de pression entre chaque étage.

Une autre façon de disposer les modules consiste à pressuriser et à faire recirculer le fluide au niveau de chaque étage. Dans ce cas, les paramètres hydrodynamiques tels que la pression transmembranaire et la vitesse de circulation peuvent être optimisés sur chaque étage. Cependant, cette configuration implique des coûts d'investissement et de fonctionnement plus importants à cause essentiellement des pompes supplémentaires qui assurent la circulation.

D'autres systèmes plus sophistiqués peuvent être mis en œuvre dans le cas où les deux configurations précédentes ne permettent pas d'obtenir une qualité suffisante de filtration et de séparation des produits à traiter.

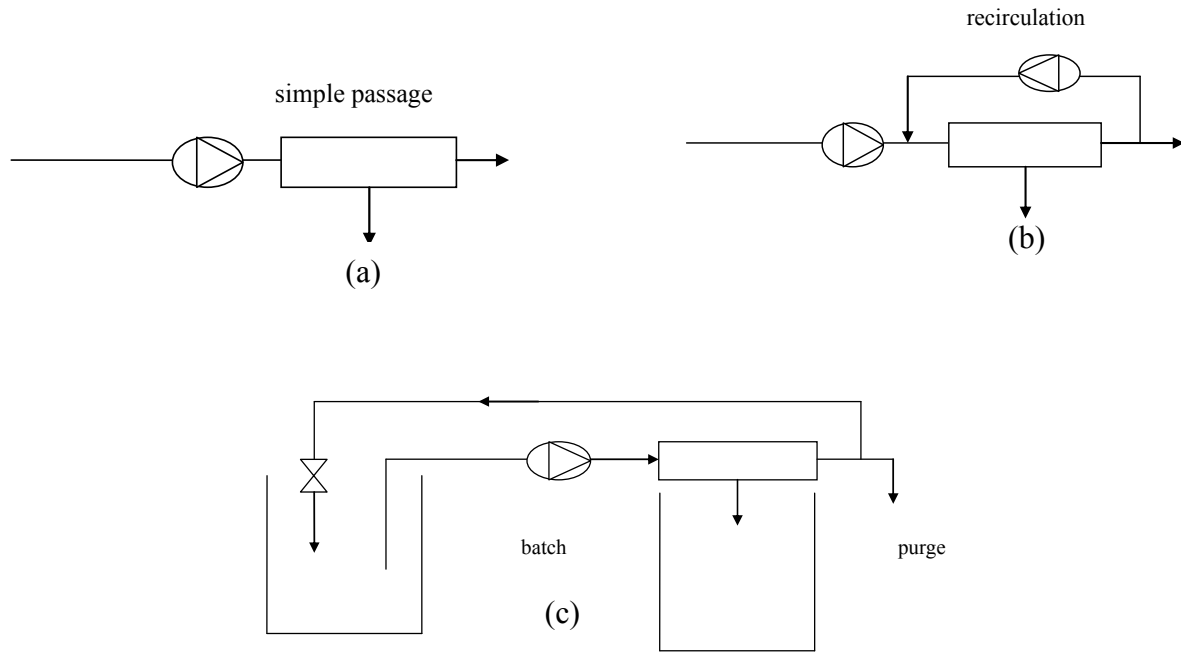


Figure 1. Différentes configurations des modules dans une installation de séparation par membranes.

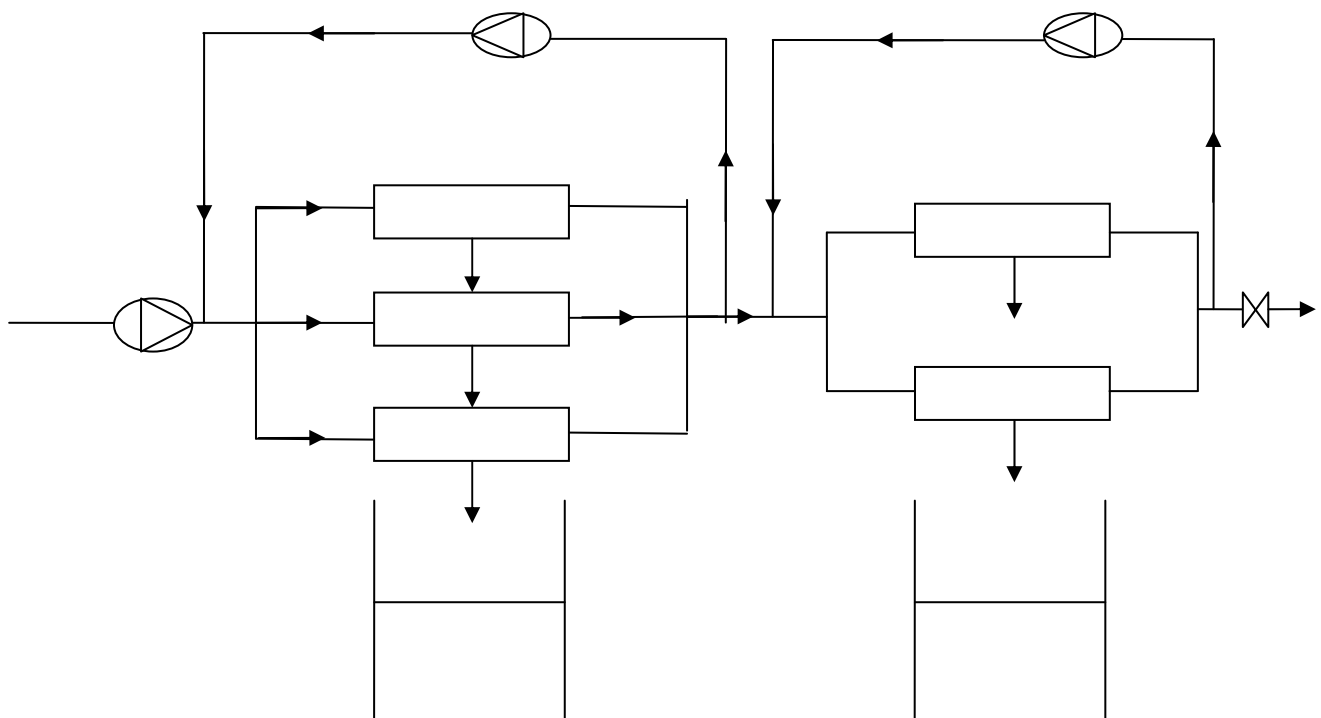


Figure 2. Installation en série ou/et en parallèles de modules membranaires.

4-1-3- Les variables opératoires

L'efficacité du procédé membranaire est fonction de plusieurs caractéristiques pouvant être regroupées en trois composants : la membrane, le produit et les conditions opératoires. Les propriétés de la membrane comprennent sa perméabilité, son seuil de coupure ou/et la distribution de taille des pores et sa géométrie (plane, tubulaire, spiralée). Les propriétés du produit à filtrer sont constituées par la concentration et la taille des solutés, sa viscosité et sa composition chimique. Les variables opératoires sont la pression transmembranaire (P_{tm}) qui correspond à la force motrice du transfert de matière à travers le milieu poreux, la vitesse tangentielle (U), la température (T) et le facteur de réduction volumique (FRV). Le FRV correspond au rapport du volume de jus ayant alimenté l'unité de filtration et du volume total de rétentat obtenu. Il rend compte en fait de la répartition des volumes entre le perméat et le rétentat à un instant donné.

Une augmentation de la P_{tm} influence la densité de flux de manière assez variable et complexe, tandis que l'effet de la vitesse sur les jus de fruits semble toujours être positif sur le flux. La vitesse tangentielle de circulation va modifier les conditions hydrodynamiques au voisinage de la surface. De même une élévation de la température induit une amélioration sensible des performances de filtration compte tenu de la baisse de viscosité. La température va également jouer un rôle dans le phénomène de colmatage des membranes. L'augmentation du FRV a un effet négatif sur le flux de perméat. L'influence d'une augmentation de ces différents paramètres est schématisée sur la **figure 3**.

4-1-4- Identification des composés colmatants et de leurs interactions

Le colmatage peut être défini comme l'ensemble des phénomènes qui interviennent dans la modification des propriétés filtrantes d'une membrane, exceptée la compaction et les modifications chimiques du matériau membranaire (34). Il s'agit de phénomènes physiques, chimiques ou biologiques se produisant à l'interface membrane-solution ou dans le volume poreux. Ces phénomènes conduisent à l'obstruction partielle des pores de la membrane, ce qui entraîne à la fois des variations de perméabilité et de sélectivité. Le colmatage résulte d'une accumulation de matière à la surface de la membrane (colmatage externe) ou dans la structure poreuse de la membrane (colmatage interne).

Le phénomène de colmatage est sans doute le facteur limitant majeur de la filtration tangentielle sur membrane, car il limite considérablement les performances de la filtration.

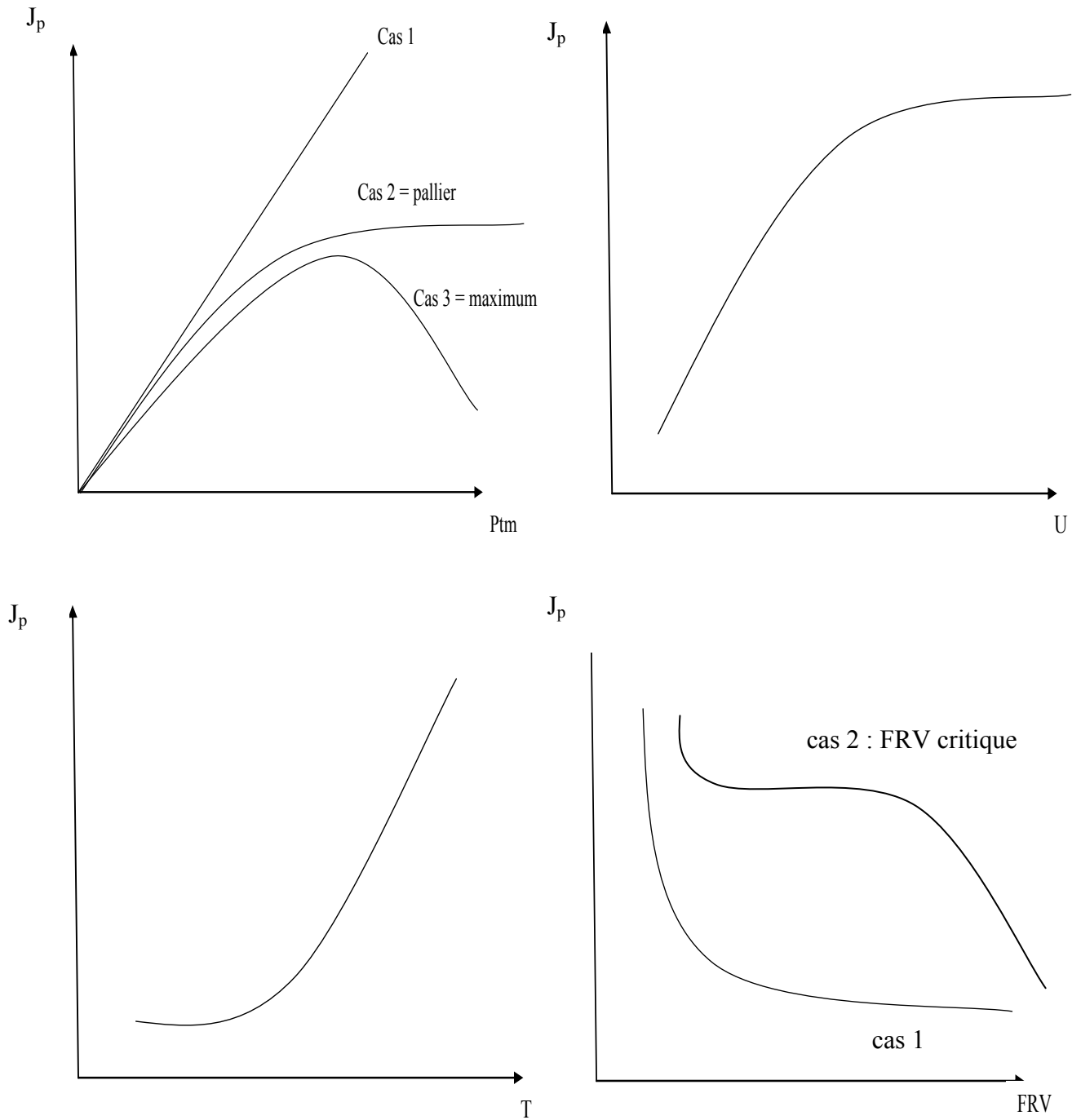


Figure 3. Influence d'une augmentation des paramètres opératoires sur la densité de flux de perméat (J_p) pour la filtration tangentielle de jus pulpeux

4-1-4-1- Les composés colmatants insolubles

Dans le cas des jus de fruits, les composés insolubles correspondent essentiellement aux fragments des membranes cellulaires des fruits. Leur taille varie selon le fruit et dépendent de la méthode d'extraction du jus choisie. Aussi, au cours du procédé, ces fragments peuvent s'agglomérer et former de gros agrégats (35, 36). D'une façon générale, la présence de particules en suspension retenues par la membrane augmente la résistance et diminue les performances de la filtration (37, 38).

4-1-4-2- Les composés colmatants solubles

Les substances qui colmatent les membranes ne sont pas uniquement celles dont le diamètre est supérieur au diamètre des pores. Il existe en plus des solides insolubles en suspension d'autres composés colmatants dont les plus pertinents pour les jus de fruits sont reportés dans le **Tableau 4**. Les composés solubles colmatants correspondent principalement aux macromolécules solubilisées à partir de la lamelle moyenne lors de l'extraction du jus. Les principaux représentants sont les pectines, qui possèdent un fort pouvoir colmatant dû à leur propriété de gélification lorsque les conditions de concentration et de pH sont favorables.

4-1-5- Evaluation des performances

Les critères de performance peuvent être différents selon l'application recherchée et la valeur ajoutée du produit. D'une manière générale, on peut distinguer trois principaux critères : le flux de perméat, la sélectivité et la consommation énergétique.

Le flux de perméat conditionne la surface de membrane et le nombre de modules à installer et donc le coût d'investissement du procédé. Dans le cas de la microfiltration ou de l'ultrafiltration, il peut être défini par l'équation (10).

$$J_p = \frac{\Delta P}{\mu (R_m + R_c)} \quad (10)$$

où J_p est la densité de flux de perméat, ΔP est la pression transmembranaire, μ est la viscosité dynamique du produit à traiter et R_m et R_c respectivement la résistance de la membrane propre et la résistance additionnelle liée au colmatage.

Tableau 4. Composés solubles potentiellement colmatants présents dans les jus de fruits et leur contribution au colmatage.

Composés colmatants	Contribution au colmatage			Références
	Interaction physique avec la membrane	Interaction chimique avec la membrane	Interaction chimique entre composés	
Sucres	-	-	Indirecte en présence de pectine	(39)
Composés pectiques	Importante à cause de la texture gel	Non	Gel en présence de sucre et acide	(40, 41)
Cellulose ou hemicellulose	Importante	Non	Non	(42, 43)
Protéine	Non	Importante	En présence de tanins	(44, 45)
Tannin, polyphénols	Non	Non	En présence de protéines	(46)
Colloïdes	Importante	Non	Non	(37, 47)
Minéraux	Non	Non	Indirecte, gel pectique (ions bivalents)	(41, 48)

La pression transmembranaire ΔP est calculée à partir de la pression d'entrée (P_e), de la pression de sortie (P_s) du rétentat et de la pression dans le perméat (P_p) obtenue grâce à l'équation 11. La résistance membranaire R_m est déterminée à partir de la perméabilité à l'eau de la membrane.

$$\Delta P = \frac{P_s - P_e}{2} - P_p \quad (11)$$

La sélectivité garantit la qualité du produit recherché (concentrat et/ou perméat). Elle s'obtient souvent au détriment du flux de perméat et peut être reliée au taux de rétention observé (R_{obs}) des espèces à séparer. Le taux de rétention est calculé à partir de la concentration initiale (C_a) de chaque espèce dans la solution d'alimentation et la concentration finale (C_p) de la même espèce dans le perméat.

$$R_{obs} = \left(\frac{C_a - C_p}{C_a} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

Exprimé en pourcentage, le taux de rétention pour une substance donnée dépend des conditions opératoires et du milieu.

La consommation énergétique de l'installation représente une partie non négligeable du coût de fonctionnement du procédé. Cette consommation est due d'une part à la mise sous pression des modules et d'autre part à la recirculation du fluide. Elle dépend du type de module utilisé

et de la configuration des modules entre eux. Les performances des modules peuvent évoluer au cours du temps, notamment à cause de la mise en place des phénomènes de polarisation ou du colmatage des membranes.

Pour une solution donnée à filtrer, l'influence des paramètres opératoires sur les performances du procédé membranaire est différente selon le type de membrane utilisé, et selon la géométrie et l'hydraulique du module. Le choix de la membrane et du type de module dans une installation est un premier élément important de réponse aux critères technico-économiques.

4-1-6-Application des procédés baromembranaires

Les procédés baromembranaires sont utilisés dans plusieurs opérations unitaires : clarification, standardisation, dépollution, purification, concentration, adoucissement, séparation et déminéralisation. Elles sont utilisées dans presque tous les secteurs d'activités (**Tableau 5**). Les grands marchés sont actuellement l'industrie agro-alimentaire, la pharmacie, les biotechnologies et le traitement de l'eau. Le traitement des effluents et des eaux usées, en particulier par bioréacteur à membrane est en pleine expansion. La chimie et les industries de traitement de surface sont également utilisateurs de ces techniques.

En agroalimentaire, l'utilisation des procédés baromembranaires est relativement récente mais se développe de plus en plus (**Tableau 6**). Les applications de la microfiltration tangentielle et de l'ultrafiltration sont beaucoup plus anciennes et nombreuses que celles de la nanofiltration.

4-2- Microfiltration tangentielle des jus de fruits

La microfiltration tangentielle (MFT) des jus pulpeux présente un intérêt croissant depuis quelques années du fait de l'amélioration des performances et de la diminution des coûts d'investissement et de remplacement des membranes. Dans le domaine de la transformation des jus de fruit, la MFT peut être utilisée soit pour obtenir des jus clarifiés sans pulpe soit pour produire des jus stabilisés du point de vue microbiologique sans qu'il soit nécessaire de réaliser postérieurement un traitement thermique de pasteurisation du perméat.

4-2-1- Définition et principe

La microfiltration tangentielle est un procédé baromembranaire de séparation solide-liquide qui met en œuvre des membranes dont les diamètres de pores sont compris entre 100 et 5000 nm (34). Dans le cas des jus de fruits, ce procédé permet donc la rétention des particules en suspension et des bactéries.

Tableau 5. Utilisations industrielles représentatives des procédés membranaires.

Procédé	Industries alimentaires	Autres industries
Microfiltration	<ul style="list-style-type: none"> - Clarification des boissons - Stérilisation de liquide 	<ul style="list-style-type: none"> - Récupération des particules microniques à partir de divers liquides - Etape de prétraitement pour l'osmose inverse, l'ultrafiltration et la nanofiltration - Stérilisation de solutions diverses dans l'industrie pharmaceutique - Purification des fluides dans l'industrie des semi-conducteurs
Ultrafiltration	<ul style="list-style-type: none"> - Séparation des émulsions huile-eau - Clarification de liquides - Etape de prétraitement pour l'osmose inverse et la nanofiltration - Concentration de protéines 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentration de particules de latex dans l'eau et récupération de particules de latex à partir d'effluents aqueux - Déshydratation partielle des boues argileuses - Récupération de polymères à partir d'effluents aqueux - Séparation de composés cireux à partir d'hydrocarbures de faible masse molaire
Nanofiltration	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'eau potable à partir d'eau de mer et d'eau saumâtre - Concentration du lait et du petit lait pour la fabrication de fromages - Récupération des sucres dans les étapes de procédés alimentaires 	<ul style="list-style-type: none"> - Récupération des colorants dans les effluents aqueux - Régénération des effluents des bains d'électrodéposition - Prétraitement de l'eau d'alimentation des chaudières - Diminution de la demande chimique en oxygène dans des effluents aqueux - Récupération d'ions divers à partir d'effluents aqueux - Concentration des lessives épuisées de sulfites à partir des effluents de l'industrie du papier

Tableau 6. Exemples d'applications industrielles en agroalimentaire de la microfiltration tangentielle (MFT) de l'ultrafiltration (UF) et de la nanofiltration (NF).

Secteur	Produit	But de la séparation	MFT	UF	NF
Lait et dérivés	Lactosérum	Concentration		X	X
	Lait	Concentration Stabilisation	X	X	
Boissons	Eau	Recyclage		X	
	Jus de fruits	Clarification	X	X	
Boissons alcoolisées	Bière	Clarification	X		
	Vin	Clarification	X		
		Stabilisation	X		
Vinaigre		Clarification	X		
Alimentation animale	Plasma	Extraction	X	X	

La séparation est effectuée sous l'effet d'un gradient de pression. Le fluide traité circule tangentiellement à la membrane pour limiter l'accumulation de matière occasionnée par le flux de matière transversal généré par le gradient de pression au travers de la membrane.

4-2-2- Intérêts de la microfiltration tangentielle

La séparation à partir d'un jus de fruit pulpeux, des solides insolubles en suspension et du sérum peut s'effectuer à l'aide de différentes techniques dont les procédés physiques comme la centrifugation, la décantation, la filtration frontale puis les traitements enzymatiques, généralement en combinaison avec les procédés physiques. Néanmoins, pour les fluides chargés, les techniques en flux tangentielle sur membrane se sont imposées ces dernières années dans l'industrie des jus de fruit pour clarifier, stabiliser les jus de fruits ou produire de nouveaux produits avec diverses applications. Le **tableau 7** donne des exemples d'application de la microfiltration tangentielle dans le domaine des jus de fruits.

La microfiltration tangentielle a été utilisée pour clarifier les jus de fruits notamment les jus de pomme (49) de raisin (50), d'ananas, de mandarine, de mûre de Castille, de jus de fruit de la passion (51), de poire et d'agrumes (52), de jus d'orange (6) etc. Elle est également utilisée pour la clarification de nectars et boissons alcoolisées ou non produits à partir de fruits et céréales. C'est le cas par exemple, du tamarin (53), du nectar du fruit du baobab (54), du nectar de mangue (51), du sirop de maïs (44), du vin de riz (38), de la bière sans alcool (36).

Depuis quelques années, la microfiltration tangentielle est utilisée pour stabiliser à froid les produits thermosensibles ou contenant des molécules actives. Elle est ainsi mise en œuvre

pour stabiliser les jus de raisin en protégeant les composés phénoliques, (55), les jus d'ananas en préservant les composés aromatiques (56, 57), le jus d'acérole très riche en vitamine C (58). Les jus clarifiés obtenus pourront être utilisés en tant que tels ou dans différents produits tels les cocktails de jus clarifiés, les liqueurs alcoolisées, les boissons gazeuses, les eaux minérales aromatisées (43). La clarification peut également faciliter les procédés qui interviennent plus en aval telles la concentration, la désacidification par électrodialyse ou l'extraction de micronutriments (6, 7, 59).

La microfiltration tangentielle, alternative intéressante à la décantation avec adjuvants de filtration, permet de raccourcir considérablement la durée des opérations et de limiter les temps de séjour en cuve, grâce à un fonctionnement en continu ou semi-continu. Pour un effet de clarification équivalent, la durée est de 2 à 3 h en MFT contre 25 h en moyenne pour le procédé par décantation (60). A ces avantages économiques (économie d'adjuvant de filtration, d'énergie, de matériel, de main d'œuvre) s'ajoutent des améliorations au niveau organoleptique, nutritionnel et microbiologique du produit (6, 7, 56).

En microfiltration tangentielle, s'offre la possibilité de mieux maîtriser la taille des composés retenus en fonction du diamètre de pore utilisé (**Tableau 8**). Ainsi, la microfiltration, méthode de clarification, permet de retenir partiellement ou totalement, selon la taille des pores, les microorganismes, les agrégats protéiques, certains composés aromatiques liés à la fraction insoluble, etc. présents dans les fluides traités.

4-2-3- Les membranes en microfiltration

Le flux et la qualité du jus clarifié sont deux aspects essentiels pour le choix de la membrane à utiliser. Un flux élevé est nécessaire pour des raisons pratiques et économiques et la qualité du produit final doit au moins être égale à celle obtenue avec les procédés conventionnels de clarification. Les facteurs à considérer dans la sélection de la membrane sont : sa géométrie, son matériau et le diamètre des pores.

4-2-3-1- Géométrie et matériaux utilisés

Pour le traitement des jus de fruits pulpeux, pratiquement tous les types de membranes ont été utilisés : organiques et minérales, planes, tubulaires et fibres creuses (**Tableau 7 et 8**). La seule restriction est que, pour éviter de boucher l'espace inter-membranaire avec la pulpe, celui-ci doit être suffisamment important et être au moins supérieur à environ dix fois la taille des particules en suspension. Après un prétraitement intensif (tamisage, enzymage, centrifugation) qui permet de réduire la taille des particules solides insolubles en suspension, pratiquement toutes les configurations de membranes sont alors possibles.

Tableau 7. Exemples d'application de la microfiltration tangentielle pour le traitement de jus de fruits et diverses boissons.

Produits	Caractéristiques de la membrane Matériau/géométrie/surface (m ²)	Diamètre de pore (μm)	Pression (kPa)	Température (°C)	Vitesse tangentielle (m.s ⁻¹)	FRV	Flux (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	Référence
Jus de raisin	Céramique/fibres creuses/0,75	0,2	200	35	1,16	1,0	27	(50)
					2,33		30	
					3,49		33	
Jus de fruit de la passion	Céramique/tubulaire multicanaux/0,48	0,2	150	36	7,0	1,0	40	(43)
Jus de mûre	Céramique/tubulaire multicanaux/0,22	0,2	150	25	5,0	8,0	70	(61)
Jus d'acérole	Polyéthersulfone/tubulaire/0,05	0,3	100	30	6,0	2,8	26	(58)
			93	35	4,0	2.2	48	(62)
Jus d'umbu	Polypropylène/tubulaire/0,038	0,2	194	35	4,0	2.2	66	
Jus de melon	Céramique/tubulaire/0,22	0,2	150	35	7,0	3,0	75	(7)
Jus d'orange	Céramique/tubulaire/0,22	0,2	400	20	7,0	3,5	62	(6)
Jus de mangue	Céramique/tubulaire/0,48	0,2	150	30	7,0	1,3	60	(51)
Jus de tamarin	Polypropylène/tubulaire/0,038	0,2	50	35	4,0	2,0	87	(53)
			110	35	4,0	2,0	98	
Bière sans alcool	Alumine/tubulaire/0,03	0,45	50	7	2,0	1,0	10	(36)
			150	7	2,0	1,0	26	
Vin de riz	Céramique/tubulaire/0,003	0,2	100	15	2,0	1,0	54	(38)

Tableau 8. Exemple de rétention de composés dans les jus de fruits clarifiés par microfiltration tangentielle.

Jus de fruits	Caractéristiques de la membrane Matériau/géométrie/surface (m²)	Diamètre de pore (µm)	Composés	% Rétention	Références
Orange	Céramique/tubulaire multicanaux/0,22	0,2	Pulpe Terpènes (Limonène, valencène)	100 44 - 100	(6)
Ananas	Polyéthersulfone/tubulaire/0,05	0,1 à 0,2	Solides insolubles en suspension, micororganismes	100	(56, 57)
Bière	Alumine/tubulaire/0,03	0,45	Solides insolubles en suspension, levures	100	(36)
Sirop de maïs	Céramique/tubulaire/0,005	0,1 à 0,2	Solides insolubles en suspension Protéine	99 80	(44)
Nectar de baobab	Céramique/tubulaire multicanaux/0,22	0,2	Solides insolubles en suspension Vitamine C	100 5	(54)
Melon	Céramique/tubulaire multicanaux/0,22	0,2	Microorganismes β-carotène	100 100	(7)

Au plan industriel, les membranes minérales sont les plus appropriées pour le traitement des jus pulpeux. En effet, grâce à leur résistance physico-chimique, elles supportent des cycles de nettoyage intensifs (pH extrêmes et températures élevées). De plus, leur robustesse les rend également compatibles avec les systèmes de décolmatage à contre-courant. Bien que plus coûteuses par rapport aux membranes organiques, leur durée de vie qui est de plusieurs années en utilisation continue ce qui conduit aussi à des coûts d'entretien et de remplacement relativement faibles.

4-2-3-2- Choix du diamètre des pores

La sélection du diamètre de pore a un impact aussi bien sur le flux que sur la qualité des jus clarifiés sur membrane (**Tableau 7 et 8**). En l'absence de traitement enzymatique, une couche de colmatage à porosité très fine, qui serait constituée principalement par des substances pectiques, peut se former à la surface de la membrane. Celle-ci peut alors devenir une membrane d'ultrafiltration avec un pouvoir de rétention sans commune mesure avec la taille réelle des pores (34). Les flux induits sont alors relativement faibles et complètement indépendants du seuil de coupure ou du diamètre de pore de la membrane. Ce phénomène a été observé lors de l'application au jus d'orange traité tel quel (63).

La situation semble différente lorsque le jus est traité enzymatiquement avant la filtration. Dans ce cas, les débits de perméat semblent augmenter en fonction du diamètre de pore. C'est le cas par exemple, pour le jus d'ananas (56), le jus de mosambi (64, 65). Dans certains cas, un diamètre de pore plus faible induit de meilleures performances, même pour des jus préalablement enzymés. Par exemple, sur le jus de pomme, une membrane de 0,02 μm donne de meilleurs résultats qu'une membrane de 0,2 μm (66). Ce phénomène peut être du à une moindre incidence du colmatage interne par des particules de diamètre du même ordre de grandeur que les pores de la membrane.

Le choix du diamètre de pore est donc complexe. En effet, différents phénomènes antagonistes interviennent à ce niveau et il est quasiment impossible de prévoir les résultats sans réaliser des expériences sur installation pilote.

4-3- Ultrafiltration

4-3-1- Définition et principe

L'ultrafiltration est un tamisage moléculaire obéissant aux lois de la filtration mais qui n'exclut pas qu'interviennent des interactions physico-chimiques entre les espèces et la membrane (31, 34).

L'ultrafiltration est utilisée pour la concentration à moindre coût énergétique de solutions macromoléculaires (enzymes, protéines, virus, polyosides, polyphénols condensés etc.) ; la

rétenion de solutés plus ou moins nocifs (bactéries, métaux lourds, pesticides, etc.) ; le fractionnement par élimination des petits solutés comme par exemple la récupération de protéines à partir du lactosérum, de l'alcool polyvinylique dans les eaux mères de l'industrie textile, de pigments présents dans les bains d'électrophorèse, etc. (67-71).

L'ultrafiltration utilise des membranes microporeuses dont les diamètres de pores sont compris entre 2 et 100 nm (34). Par filtration, de telles membranes laissent passer les petites molécules (eau, sels) et arrêtent les molécules de masse moléculaire élevée (polymères, protéines, colloïdes) sous l'effet d'une différence de pression entre les deux compartiments. L'ultrafiltration est un procédé pouvant fonctionner en régime discontinu, continu, en mode frontal ou avec une circulation tangentielle. Le mode tangentiel est le plus largement répandu.

4-3-3- Caractéristiques des membranes d'ultrafiltration

Deux paramètres caractérisent une membrane d'ultrafiltration en plus des caractéristiques structurales. Il s'agit de la perméabilité et du seuil de coupure (cut-off). Le seuil de coupure indique la taille à partir de laquelle les molécules seront entièrement retenues. Le **tableau 9** donne quelques caractéristiques de quelques membranes d'ultrafiltration. L'ensemble de ces caractéristiques ainsi que les conditions opératoires peuvent avoir des effets sur le flux de perméat comme l'illustre le **tableau 10**.

Tableau 9. Caractéristiques de quelques membranes d'ultrafiltration.

Fabricant	Désignation	Type de membrane	Seuil de coupure (kDa)	Perméabilité à l'eau* ($\text{kg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{bar}^{-1}$)
GE Osmonics	GH	-	1	6 (0,4) ^a
	GK		2	10 (0,7) ^a
	GE		1	6 (0,1) ^a
Microdyn-Nadir	UP005	Polyéthersulfone	5	26 (1) ^b
	UP020		20	116 (3) ^b
	UH030		30	119 (3) ^b
	UH050		50	237 (3) ^c
	UP150		150	243 (5) ^c

* mesurée à 35 °C, valeurs moyenne (écart-type) n = 3

^a Perméabilité à l'eau mesurée à 20 bar

^b Perméabilité à l'eau mesurée à 5 bar

^c Perméabilité à l'eau mesurée à 3 bar

4-3-4- Exemples d'applications en agroalimentaire

L'ultrafiltration est très utilisée dans l'industrie laitière d'une part, pour concentrer le lait destiné à la fabrication du fromage, d'autre part pour traiter le lactosérum. Elle est également utilisée dans l'industrie des jus de fruits. En plus du tableau 10, le **tableau 11** donne d'autres exemples de l'utilisation de l'ultrafiltration dans le domaine des jus de fruits.

4-4- Nanofiltration

4-4-1-Définition et principe

La nanofiltration (NF) est une technique baromembranaire de séparation relativement récente. Elle a été décrite pour la première fois dans les années quatre vingt (72, 73). Le champ d'application de la nanofiltration se situe entre ceux de l'osmose inverse et de l'ultrafiltration. Actuellement, elle se différencie radicalement des techniques d'osmose inverse et d'ultrafiltration grâce aux nouvelles membranes mise en œuvre. Ces dernières possèdent leurs propres caractéristiques, présentant une structure microporeuse avec des pores de diamètre inférieur à 2 nm et un matériau membranaire qui, dans la plupart des cas, porte des charges ioniques superficielles.

La nanofiltration est systématiquement utilisée en configuration tangentielle. Elle met en œuvre des pressions transmembranaires comprises entre 5 et 30 bar. Le transfert de matière repose sur plusieurs mécanismes de séparation concurrents de nature chimique, électrique et physique (74).

Ce sont à la fois les dimensions des pores et la charge des groupements ionisés ou ionisables (75, 76) qui limitent le passage des substances sous l'action de la force motrice de transfert (gradient de pression, essentiellement hydrostatique). Ainsi, les sels ionisés monovalents et les composés organiques non ionisés de masse molaire inférieure à 200-300 g.mol⁻¹ ne sont pas retenus par ce type de membrane. Les sels ionisés multivalents tels que le calcium, magnésium, aluminium, sulfates, etc. et les composés organiques non ionisés de masse molaire supérieure à environ 200-300 g.mol⁻¹ sont, par contre fortement retenus. De manière générale, il est admis que les problèmes de colmatage sont moins sensibles en nanofiltration qu'en ultrafiltration.

Tableau 10. Effet des conditions opératoires sur le flux de perméat au cours de l'ultrafiltration de quelques jus de fruits.

Produits	Caractéristiques de la membrane		Pression (kPa)	Température (°C)	Vitesse tangentielle (m.s ⁻¹)	Flux (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	Référence
	Matériau/géométrie/surface (m ²)	Seuil de coupure (kDa)					
Jus de pomme	PES/plane/1,0	50	140	50	1,5	87	(77)
			140	50	2,5	140	
			200	50	2	140	
			200	50	3	170	
			200	35	2,5	135	
			200	40	2,5	145	
			200	45	2,5	158	
	PVDF/tubulaire/0,116	18	250	50	2,3	74	(78)
Jus de mandarine	PEEKWC/fibres creuses/0,037		30	25	2,96	38	(79)
clémentine	PSU/fibres creuses/0,032	2	30	25	2,96	33	

Tableau 11. Autres exemples d'applications de l'ultrafiltration dans le domaine des jus de fruits.

Produits	Caractéristiques de la membrane Matériau/géométrie/surface (m ²)	Seuil de coupure (kDa)	Pression (kPa)	Température (°C)	Vitesse (m.s ⁻¹)	Flux (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	Référence
Jus d'orange sanguine	PVDF/ tubulaire/0,23	15	80	0-55	3,4	20	(80)
	PVDF/tubulaire/0,23		85	15	3,4	17	(81)
Jus de kiwi	PEEKWC/fibres creuses/0,002	2	75	25	3,5	25	(82)
Jus d'ananas	Céramique/tubulaire//0,01	-	200	40	1,19	124	(83)
	PS/fibres creuses//0,01	100	200	40	4,17	46	
	PS/fibres creuses/0,01	30	200	20	1,2	8,9	(84)
		100	200	20	1,2	18,7	
Jus de cactus	PVDF/plane/ 0,011	200	220	25	1,1	41,8	(85)
Infusion de thé noir	Céramique/tubulaire/0,15	40	70	50	0,49	20	(71)
			120	50	0,82	32	
			170	50	1,06	35	

4-4-2- Les membranes de nanofiltration

Une membrane de nanofiltration est composée de l'intérieur vers l'extérieur de trois structures avec des rôles bien distincts : un support macroporeux offrant une bonne résistance mécanique et autorisant des flux de perméat élevés ; une ou plusieurs couches intermédiaires, mésoporeuses ($2 \text{ nm} < d < 50 \text{ nm}$) ou macroporeuses ($d > 50 \text{ nm}$), qui assurent la liaison entre le support et la couche active ; une couche active dans laquelle se produit la séparation par nanofiltration et dont les deux caractéristiques principales sont une faible épaisseur ($< 3 \text{ }\mu\text{m}$) et des diamètres de pores de l'ordre du nanomètre.

Les membranes de nanofiltration possèdent des caractéristiques physiques, chimiques et électriques spécifiques liées à leur nature. Les membranes les plus courantes sont des membranes anisotropes homopolaires formées d'un matériau organique ou minéral.

4-4-2-1-Les membranes organiques

Les membranes de nanofiltration organiques présentent une structure composite (**Figure 4**). Une couche macroporeuse et anisotrope de polymère de 40 à 100 μm est d'abord déposée sur une matrice tissée ou non. Ensuite, une couche active de faible épaisseur, comprise entre 0,3 et 3 μm est ensuite déposée ou directement formée par polymérisation. C'est cette couche active qui confère à la membrane ses propriétés de transport et de sélectivité. En fonction de la nature du matériau des couches, les membranes organiques sont susceptibles d'être utilisées dans un domaine de pH compris entre 2 et 11 et ne supportent pas des températures supérieures à 90°C. Plusieurs polymères (72) tels que les polyéther sulfones sulfonés, des polymères réticulés à base de pipérazine, des polyamides aromatiques carboxylés réticulés et des polysulfones carboxylés entrent dans la composition des membranes organiques de nanofiltration. Ces membranes sont sensibles aux oxydants, aux solvants et aux tensioactifs. En général, elles sont une charge électrique négative, qui les fait se comporter comme une membrane échangeuse de cations. L'acétate de cellulose est utilisé dans la fabrication de membrane composite. Il va conférer à la membrane les propriétés mécaniques du support en acétate de cellulose. En effet, l'acétate de cellulose possède une résistance physique élevée. Les membranes en acétate de cellulose peuvent être utilisées jusqu'à 180° C et peuvent être stérilisées par toutes les méthodes de stérilisation (86).

4-4-2-2-Les membranes minérales

Les membranes de nanofiltration minérales ou céramiques ont une structure de base similaire à celle des membranes minérales de microfiltration ou d'ultrafiltration. Elles sont caractérisées par une couche active dont la structure microporeuse se caractérise par des diamètres de pores inférieurs à 2 nm.

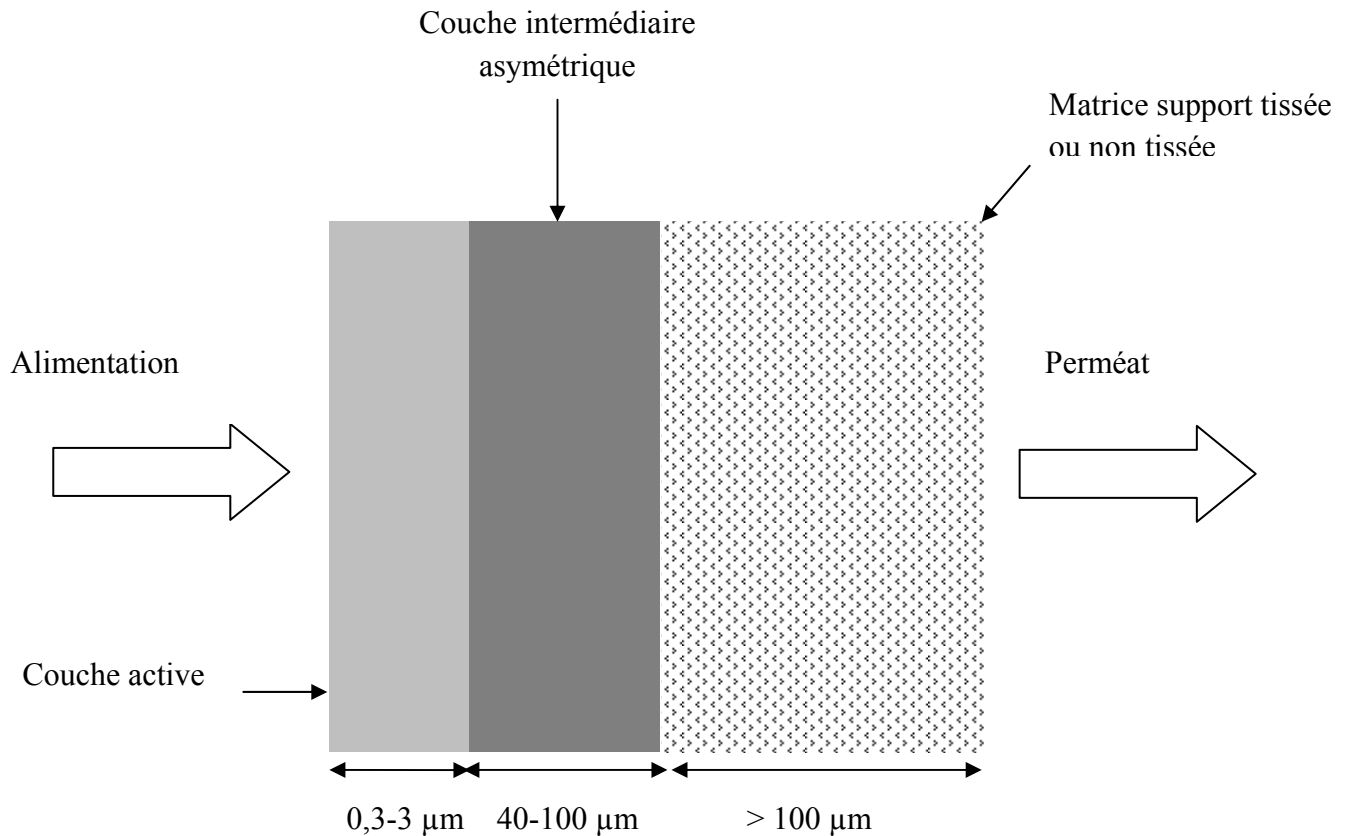


Figure 4. Représentation schématique de la structure multicouche d'une membrane de nanofiltration.

Les couches actives sont obtenues selon plusieurs techniques (hydrolyse, précipitation, sol-gel, etc.) et sont préparées généralement à base d'oxydes métalliques. Les membranes minérales de nanofiltration, électriquement neutre en milieu organique ont une charge électrique positive quand le pH du milieu est inférieur au point isoélectrique (PIE) du matériau qui les constitue et une charge négative quand le pH du milieu est supérieur à ce PIE (73). Elles vont alors se comporter soit comme des membranes échangeuses d'anions, soit comme des membranes échangeuses de cations avec une bonne tenue en pH et en température (Tableau 12).

Tableau 12. Point isoélectrique et mode de préparation de quelques oxydes utilisés dans la préparation des membranes minérales (72, 73).

Oxyde métallique	Point isoélectrique (PIE)	Mode de préparation
$\gamma \text{ Al}_2\text{O}_3$	8-9	Méthode sol-gel
$\alpha \text{ Al}_2\text{O}_3$	7-9	Traité $> 1000^\circ\text{C}$
SiO_2	2-3	Précipitation
TiO_2	5-6	Hydrolyse de TiCl_4
ZrO_2	6-7	Méthode sol-gel

Le **tableau 13** présente les caractéristiques de quelques membranes de nanofiltration provenant de plusieurs fabricants. Le taux de rétention, une des caractéristiques, est donné par le fabricant de la membrane à des conditions précises (température, concentration) et souvent pour des ions monovalents ou divalents (NaCl, Na₂SO₄, MgSO₄).

4-4-3- Applications de la nanofiltration en agroalimentaire

La nanofiltration, technologie innovante, fait l'objet de nombreuses applications. Les principaux domaines actuels sont la séparation de petites molécules dans la pharmacie, les biotechnologies, la chimie, la cosmétique, l'électronique, l'énergie, l'hémodialyse, la mécanique, les mines, le textile, les traitements de surface et surtout le secteur de l'eau et de l'environnement (72, 74, 87-91). Les applications en agroalimentaire sont très limitées et se retrouvent principalement dans le traitement de l'eau (92-97) et dans l'industrie laitière (4, 98-100). Dans cette dernière, la nanofiltration est utilisée essentiellement pour le traitement des eaux résiduaires ou la concentration de composés ou de sous-produits tels que le lactosérum, les protéines, les matières grasses, etc. Récemment des applications sur les jus de fruits sont mises en œuvre. Elles sont peu nombreuses et sont axées principalement sur l'élimination de composés tels que les polyphénols ou des composés colorés indésirables dans les jus de fruits. Quelques rares essais de concentration sont mentionnés. Le **tableau 14** donne quelques exemples d'applications de la nanofiltration dans le domaine des jus de fruits. L'analyse du tableau montre que les conditions opératoires telles que la nature de la membrane, la pression transmembranaire, la température, le débit du jus de fruit à traiter et par conséquent sa vitesse tangentielle de circulation ont des effets sur le flux de perméat et la capacité de rétention des membranes. On peut remarquer à ce niveau que les densités de flux de perméat obtenus sont faibles ($< 10 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$).

Conclusion

La mise en œuvre de la filtration sur membranes impose des essais expérimentaux tant la complexité des choix des prétraitements (conditionnement ou pré-séparation) et des conditions de filtration, est grande. L'étude de la faisabilité et de l'optimisation de ces procédés peut être menée à l'échelle du laboratoire ou sur pilote semi-industriel en utilisant des volumes réduits de produit. Ce travail expérimental doit permettre de choisir la membrane capable d'assurer la sélectivité voulue et les meilleures conditions hydrodynamiques pour préserver la productivité sans entraîner un colmatage trop important. L'extrapolation à une unité industrielle sans risque important de dérives peut ensuite être envisagée.

Pour notre étude, nous avons choisi d'adopter cette démarche afin d'étudier les potentialités de l'ultrafiltration et de la nanofiltration pour produire un extrait anthocyanique à partir des calices d'*Hibiscus sabdariffa* après une extraction aqueuse.

Tableau 13. Propriétés et caractéristiques de quelques membranes de nanofiltration (3, 4, 73, 75, 101, 102).

Fabricants	Référence	Matériau	Seuil de coupure (Da)	Température maximale (°C)	Gamme de pH admissible	Densité de flux à l'eau (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	Taux de rétention (%)
Danske Separation System As (DSS AS)	NF 45	Polyétheramine (PEA), film mince composite sur polypropylène	-	45	2 - 10	-	40 - 50
Hoechst (NADIR)	NF 10	Polyéthersulfone (PES)	-	110	1 – 14	200 – 400 ^a	10 – 20 ^b
	NF 30	Acétate de cellulose (AC)	-	35	2 – 9	200 – 250 ^a	70 – 80 ^b
Koch Membrane System	MPT 10	-	200	60	2 – 11	-	-
	MPS 34	-	300	70	0 – 14	-	-
GE Osmonics	SX	Acétate de cellulose	400 - 500	50	2 – 8	-	50 – 70 ^c
	DK, DL	-	150 - 300	50	2 -8	-	
PCI Membrane System	CDA 40	Acétate de cellulose	-	30	2,0 – 7,3	-	60 ^d
Stork friesland B.V.	B 45	-	-	45	2 – 11	-	90 ^e

^a mesurée en cellule agitée à 30 °C à 40 bar ; ^b pour le lactose ; ^c pour NaCl en solution à 0,2 % en masse à 25 °C sous 13,8 bar ; ^d pour une solution de saccharose ; ^e solution contenant 0,2 % MgSO₄ en masse

Tableau 14. Quelques applications de la nanofiltration dans le domaine des jus de fruits.

Produits	Caractéristiques de la membrane Référence Matériau/géométrie/surface (m ²)	Pression (MPa)	Température (°C)	ESS initial (g.kg ⁻¹)	ESS final (g.kg ⁻¹)	Densité de flux de perméat (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	Taux de rétention (%)	Référence
Jus de pomme	AFC 80 Polyamide/tubulaire/0,226	1,2	30	100	107	5,9	59 (ESS)	(75)
	MPT-34 Polyamide/tubulaire/0,226	1,2	30	100	106	1,8	92 (ESS)	
Jus de poire	AFC 80	1,2	30	100	105	5,6	54 (ESS)	
	Polyamide/tubulaire/0,226							
	MPT-34 Polyamide/tubulaire/0,226	1,2	30	100	103	1,4	74 (ESS)	
Jus d'argousier	Polyamide/plane/0,036	3,0	30	40	150	8,0	-	(103)
Jus de raisin	DS	3,2	15	-	—	5,4	83	(104)
	-/spiralé/0,08						(polyphénols)	
	DK -/spiralé/0,08	3,2	15	-	-	3,6	90 (polyphénols)	
Jus de fruits d'aronia	BQ01 -/plan/0,0012	2	25	-	-	-	99 (anthocyane)	(105)

ESS : extrait sec soluble

5-L'évaporation osmotique

L'évaporation osmotique a été brevetée pour la première fois par une équipe australienne en 1986 (106). C'est donc un procédé membranaire récent développé principalement pour la concentration des liquides thermosensibles (106-108).

5-1- Principes fondamentaux

L'évaporation osmotique est un procédé de séparation membranaire dans lequel une membrane microporeuse hydrophobe sépare deux solutions aqueuses d'activités d'eau différentes. Le caractère hydrophobe de la membrane empêche les liquides de pénétrer dans ses pores qui restent donc remplis d'air. La membrane fonctionne comme un fin film stagnant d'air ou de vapeur, piégé entre les deux solutions et dans lequel les composés volatils sont libres de migrer par convection ou diffusion (109-111). Le principe du procédé est schématisé sur la **Figure 5**

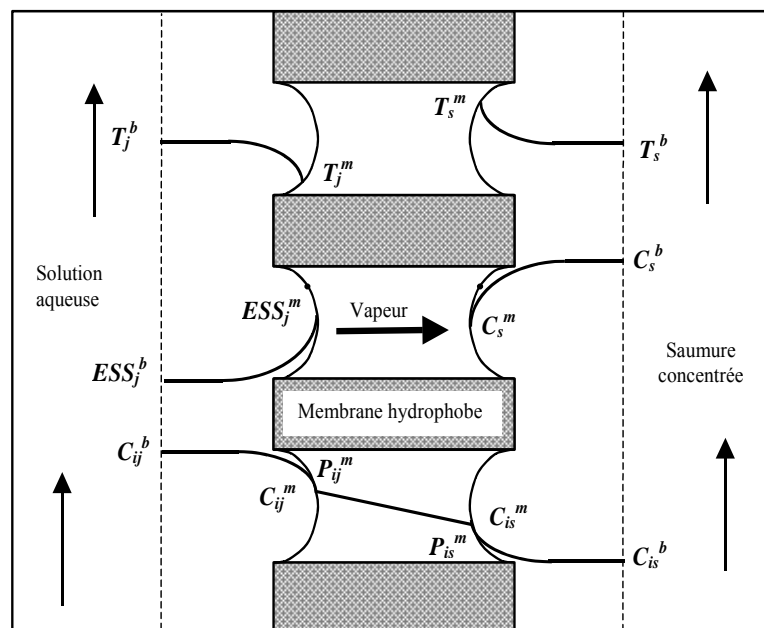


Figure 5. Représentation schématique des transferts à travers la membrane microporeuse hydrophobe en évaporation osmotique.

L'activité de l'eau de la solution aqueuse est beaucoup plus élevée que celle de la solution saline. La force motrice de ce transfert de matière est le gradient de pression partielle de vapeur d'eau entre les interfaces liquide-vapeur.

L'eau s'évapore à l'interface où la pression partielle est élevée sous forme de vapeur d'eau et est transportée par diffusion dans le gaz immobile contenu dans les pores de la membrane pour se condenser à l'interface où la pression partielle d'eau est faible.

L'eau est donc extraite de la solution diluée vers la saumure. La densité de flux ou flux évaporatoire (J_w) exprimée en $\text{kg.m}^2.\text{s}^{-1}$ est proportionnelle à un coefficient de transfert de matière (K_m) dit également perméabilité membranaire (Equation 12) qui reflète la résistance de la membrane au transfert:

$$N = K_m \cdot \Delta P_w \quad (12)$$

où K_m est le coefficient de transfert de matière en $\text{kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$, ΔP_w est la différence de pression partielle de vapeur d'eau aux interfaces liquide/vapeur (Pa).

5-2- Variables du procédé

Les travaux antérieurs montrent que le procédé d'évaporation osmotique dépend de plusieurs variables (112-115). Tout comme les autres procédés membranaires, les caractéristiques de la membrane sont déterminantes, même si elle est assimilée à une simple barrière physique séparant les deux phases. Le type de solution réceptrice est également un autre paramètre essentiel du procédé. Enfin, les variables thermodynamiques et hydrodynamiques régissent les transferts de matière au travers de la membrane.

5-2-1- La membrane

En évaporation osmotique, les membranes doivent être le siège de transport de matière en phase gazeuse tout en étant en contact direct avec des solutions aqueuses. Ceci implique l'utilisation de membranes poreuses et forcément non mouillables, c'est à dire hydrophobes. En outre, elles doivent être capables d'assurer une densité de flux en eau satisfaisante, être chimiquement inertes vis-à-vis des solutions avec lesquelles elles sont en contact, et doivent également garantir l'intégrité de la phase gazeuse occluse dans les pores (116).

Afin d'assurer un flux évaporatoire important, la membrane doit présenter une résistance au transfert de matière la plus faible possible. Cette résistance dépend des caractéristiques structurales de la membrane, à savoir, l'épaisseur, le diamètre des pores, la porosité, ainsi que d'autres paramètres plus difficiles à quantifier comme la tortuosité.

5-2-1-1- Hydrophobicité et mouillabilité de la membrane

En évaporation osmotique, la membrane est utilisée comme un contacteur. Son rôle consiste donc essentiellement à séparer deux solutions d'activité d'eau différente par l'intermédiaire d'une phase gazeuse (117, 118). La qualité de fonctionnement d'une membrane d'évaporation osmotique est donc liée à sa capacité à assurer une bonne séparation des deux phases liquides et à permettre d'obtenir des flux d'extraction élevés. Ces propriétés dépendent de la nature du polymère qui la constitue et des paramètres structurels du solide poreux (119).

- Angle de contact

Ce paramètre permet d'évaluer l'aptitude du liquide à s'étaler sur la surface considérée, et dépend des interactions entre le liquide et le solide, et des propriétés intrinsèques à la fois du solide et du liquide. Si la surface du solide est hydrophobe et l'affinité avec le liquide faible, l'angle de contact est obtus. L'angle de contact diminue lorsque l'affinité entre le liquide et le solide augmente jusqu'au point de mouillage. Lorsque $\theta = 0^\circ$, la surface est parfaitement mouillée. (Figure 6).

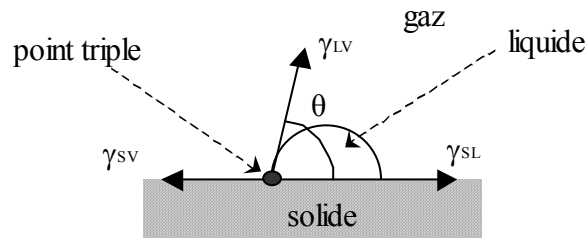


Figure 6. Angle de contact d'un liquide sur une surface lisse.

avec γ_{LV} tension superficielle du liquide, γ_{SV} énergie de surface du polymère, et γ_{SL} tension interfaciale entre le solide et le liquide.

- Mouillabilité et pression d'intrusion

Dans le cas de l'évaporation osmotique, l'intégrité de la séparation gazeuse entre les deux compartiments liquides dépend, non seulement des interactions solides/liquide, mais également de la pression transmembranaire (120-123). En effet, au delà d'une valeur critique appelée pression d'intrusion, $\Delta P_{int.}$, le liquide pénètre à l'intérieur des pores. La pression d'intrusion est généralement évaluée à partir de l'équation de Laplace (Equation 13).

$$\Delta P_{int} = P_{liquide} - P_{vapeur} = - \frac{2B\gamma_{LV} \cos \theta}{r_{max}} \quad (13)$$

où γ_{LV} est la tension superficielle du liquide, r_{max} le rayon du pore le plus grand et B est un facteur qui dépend de la géométrie du pore. Pour des pores cylindriques, B prend la valeur de 1, tandis que pour des formes plus tronquées ou plus ou moins elliptiques, $B < 1$ (116). Le **Tableau 14** regroupe quelques exemples de pressions d'intrusion de l'eau pure pour différentes membranes.

Tableau 14. Pressions d'intrusion (ΔP_{int}) et diamètre de pores (D_p) de différents types de membranes hydrophobes (124).

Membrane	D_p (μm)	(ΔP_{int}) (k Pa)
TF1000 Gelman	1,00	48
TF450 Gelman	0,45	136
TF200 Gelman	0,20	272
FHLP Millipore	0,50	124
FGLP Millipore	0,20	280
GVHP Millipore	0,20	85

Durant l'opération de concentration par évaporation osmotique, la membrane est soumise aux pressions qui règnent au niveau de ses deux faces en contact avec les liquides en circulation. Au delà d'une pression critique, l'un de ces liquides peut s'infiltrer dans la membrane et constituer des ponts aqueux capables de provoquer des fuites. Par conséquent, selon le gradient de pression, la contamination du produit à concentrer est envisageable.

5-2-1-2- Paramètres structurels de la membrane

- La porosité

La porosité volumique d'une membrane est définie comme le rapport du volume des pores sur le volume total de la membrane (119). Elle a un impact considérable sur les densités de flux de matière à travers la membrane. Plusieurs auteurs ont montré expérimentalement que le flux d'eau est directement corrélé à la porosité (125, 126). La porosité des membranes varie de 35% à 80% (108, 120, 125).

- Le diamètre des pores

Le choix du diamètre des pores doit respecter un compromis essentiel. D'une part, il doit être assez large pour faciliter le transfert de vapeur, et d'autre part, il ne doit pas dépasser un certain seuil pour éviter le mouillage de la membrane (116). Les diamètres de pore des membranes utilisées en évaporation osmotique varient entre 0,01 et 2 μm .

- L'épaisseur

Les épaisseurs des membranes utilisées en évaporation osmotique se situent dans une gamme de 10 à 800 μm . Plusieurs auteurs ont bien vérifié que la densité de flux d'eau (Équation 14) est inversement proportionnelle à l'épaisseur de la membrane (125, 127).

$$N_i = k_m \frac{r^b \varepsilon}{\tau \delta} \Delta P_{i,m} \quad (14)$$

où N_i est la densité de flux du composé i en ($\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$), k_m une constante de proportionnalité ($\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{Pa}^{-1}$), r le rayon moyen des pores (m), ε la porosité, τ la tortuosité, δ l'épaisseur de la membrane (m), $\Delta P_{i,m}$ le gradient de pression partielle du composé i aux interfaces de la membrane (Pa), et b exposant dont la valeur dépend du type de mécanisme de transfert gazeux considéré (0, 1 ou 2).

5-2-1-3- Membranes utilisées

Le choix de la membrane fait intervenir différents critères (120, 128, 129). Tout d'abord, elle doit présenter une bonne stabilité chimique et thermique, une résistance mécanique satisfaisante, un coût modéré, et doit être compatible avec les produits alimentaires. Ensuite, ses caractéristiques doivent garantir l'intégrité de la phase gazeuse occluse dans les pores et permettre d'obtenir des flux d'eau élevés.

Diverses membranes, planes ou tubulaires, adaptées à l'opération sont commercialement disponibles (**Tableau 15**). Elles sont en général constituées de polymères organiques apolaires de faible énergie de surface, comme les polyoléfines, en particulier le polypropylène (PP) et le polyéthylène (PE), ou les perfluorocarbones, essentiellement le polytétrafluoroéthylène (PTFE) et le polyfluorure de vinylidène (PVDF).

5-2-2- La solution osmotique ou extractante

La densité du flux obtenue en évaporation osmotique dépend en partie de la nature de la solution extractante (130). Toutefois, très peu d'auteurs ont étudié l'impact des différentes solutions envisageables sur l'importance du flux évaporatoire. De plus, le nombre de solutions proposées reste très limité et le nombre de solutions réellement testées est encore plus restreint.

Les solutions extractantes les plus utilisées (**Tableau 16**) présentent des solubilités élevées et correspondent le plus souvent aux solutions de chlorures des métaux alcalins et alcalino-terreux (131). Les sels les plus fréquemment cités dans la littérature sont le chlorure de sodium, de calcium et de potassium. Ceci est dû à leur caractère non toxique et à leur faible coût. On rencontre également parfois le chlorure de lithium et le sulfate de magnésium (132). Le chlorure de sodium a une solubilité dans l'eau relativement faible, ce qui limite l'activité de l'eau qu'il est possible d'atteindre ($a_w = 0,75$ à saturation à 25°C). Par contre, le chlorure de calcium a une solubilité élevée, ce qui permet d'atteindre une activité d'eau de 0,33 à saturation à 25°C. Néanmoins, il tend à précipiter en présence de dioxyde de carbone (131, 133). Le CaCl_2 est la solution extractante la plus utilisée. Elle est aussi la plus efficace parmi les solutions utilisées. Le pyrophosphate de potassium est parfois mentionné. Ce sel a une solubilité très élevée, ce qui limite les risques de cristallisation lors des procédures de régénération (121).

Tableau 15. Principales caractéristiques des membranes utilisées en évaporation osmotique.

Non commercial	Matériaux	Géométrie	Taille des pores (μm)	δ (μm)	ε (%)	Référence
TF 200	PTFE	Plane	0,2	165	60	(134)
TF 450	PTFE	Plane	0,45	178	60	
Celgard	PP	Plane	0,19 – 0,27	25	-	(135)
Accurel	PP	Plane	0,48 – 0,54	90 – 150	-	
Goretex L31189	PP	Plane	1,08	50	-	
Durapel	PVDF	Plane	0,6 – 0,81	120	-	
Sumitomo	PTFE	Plane	1,1 – 1,29	50	-	
Accurel PP Q3/2	PP	Fibres creuses	0,2	400	70	(136)
Accurel PP S6/2	PP	Fibres creuses	0,2	800	70	
Tarflen	PTFE	Plane	0,2	60	80	(137, 138)
TF 1000	PTFE	Plane	1,0	115	60	
Accurel	PP	Fibres creuses	0,5	150	66	
GVHP	PVDF	Plane	0,22	80	75	(139)
FHLP	PTFE	Plane	0,45	130	70	
Enka	PP	Plane	0,1 – 0,2	100 – 170	75	(116)
Celgard	PP	Plane	0,02	25	38	
Durapore	PVDF	Plane	0,22 – 0,45	110 – 140	75	
Celgard	PP/PE	Plane	0,05	28	45	(140)
GVSP	PVDF	Plane	0,2	108	80	
UPVP	UHMWPE	Plane	0,2	90	80	
Metricel	PP	Plane	100	90000	55	(130)
Cogia	PP	Fibres creuses	0.2	800	75	(141, 142)
Liqui-Cel	PP	Fibres creuses	0,03	30	40	(143, 144)
TF 200	PTFE	Plane	0,2	60	80	(145)
Celgard Liquicel	PP	Fibres creuses	0.3	25	40	(146)

Tableau 16. Différentes solutions extractantes utilisées en évaporation osmotique et conditions d'utilisation.

Solution extractante	Conditions opératoires	Densité de flux (kg.m ⁻² .h ⁻¹)	Produit traité	Membrane	Référence
NaCl	T = 25 °C ; 1 à 5 mol/L ; ω = 400 tpm	0,1 à 0,72	Eau	Metrcel (PP)	(130)
	T = 25 °C	0,5	Jus d'orange (50 % ESS)	Accurel PP Q3/2 (PP) δ = 200 μ m ;	(136)
	T = 25 °C ; x_{se} =25 % (m/m)	0,75	Eau	Accurel PP Q3/2 (PP) (Module LM 2P 06)	
NaCl / Glycérol	T = 25 °C ; NaCl/Glycérol = 0,34 x_{se} =35 à 50 % (m _{glycérol} /m _{eau}) ; ($u \approx 0,82$ m.s ⁻¹)	0,65 à 1,5	Eau	Accurel PP Q3/2 (PP) (Module LM 2 06)	(147)
Glycérol	T = 25 °C ; C_{se} :3 à 5,5 mol/L ; ω = 400 tpm	0,2 à 0,58	Eau	Metrcel (PP)	(130)
	T = 25 °C ; x_{se} =30 à 60 % (m/m) ; ($u \approx 0,58$ m.s ⁻¹)	0,4 à 1,2	Eau	Accurel PP Q3/2 (PP) (Module LM 2P 06)	(147)
Propylène glycol	T = 25 °C ; x_{se} =41 à 75 % (m/m)	0,68 à 1,3	Eau	Accurel PP Q3/2 (PP) δ = 200 μ m ;	(136, 147)
	T = 25 °C ; x_{se} =35 à 75 % (m/m) ; ($u \approx 0,58$ m.s ⁻¹)	0,6 à 1,6	Eau	Accurel PP Q3/2 (PP) (Module LM 2P 06)	
MgCl₂	T = 35 °C ; x_{se} =30 % (m/m)	1,6	Eau	Accurel PP Q3/2 (PP) (Module MD 020 CP 2N)	(136)
CaCl₂	T = 25-45 °C ; x_{se} =60 % (m/m)	0,4 à 1,5	Jus d'orange	Cogia PP	(6, 142)

D'autres solutions extractantes organiques notamment, le glycérol, l'éthylène glycol (EG), le propylène glycol (PG) et le tri-éthylène glycol (TEG) sont susceptibles d'être utilisées. L'utilisation de l'EG est écartée pour les aliments à cause de sa toxicité. Celere et Gostoli, (2004) (147) ont testé expérimentalement le PG et le glycérol sur une membrane tubulaire de type Accurel PP Q3/2. A saturation, et dans les mêmes conditions de débit de circulation (40 L/h) et à 25 °C, ils ont obtenu comme densité de flux évaporatoire $1,75 \text{ kg.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le CaCl_2 , $1,2 \text{ kg.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le PG et $1,05 \text{ kg.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le glycérol. Ainsi, toutes autres conditions égales par ailleurs, le CaCl_2 reste la solution extractante la plus efficace parmi les solutions utilisées.

La concentration du sel a beaucoup d'influence sur les flux d'eau car elle est directement corrélée à l'activité de l'eau (a_w) à la viscosité et à la masse volumique de la solution (108). Pour une activité d'eau identique, la nature elle-même du sel peut ou non avoir une influence sur les flux d'eau selon les conditions opératoires utilisées (128, 148).

5-3- Intérêts et limites du procédé

La concentration par évaporation osmotique présente de nombreux atouts par rapport aux techniques conventionnelles (110, 120, 149). Par exemple, elle permet le rejet de 100% des ions, des macromolécules, des colloïdes, des cellules et des autres solutés non volatils. Elle fonctionne dans des conditions modérées de température et de pression, inférieures à celles des procédés conventionnels. Les produits ne subissent pas de dégradations thermiques. Cela permet la préservation totale de la structure et de l'activité des molécules biologiques ou des micro-organismes. Ces propriétés permettent d'envisager des applications spécifiques notamment dans les domaines agroalimentaire, chimique, cosmétique et pharmaceutique.

Le caractère hydrophobe de la membrane réduit les interactions entre cette dernière et les solutions traitées. Le gradient de pression appliqué est quasiment nul, ce qui fait qu'il y a peu de problème de tenue mécanique des membranes.

De part son principe, les composés volatils existant dans la solution aqueuse diluée comme les composés d'arôme sont également susceptibles de diffuser à travers les pores. Cependant, ces composés se trouvent dans le produit à des concentrations très faibles, ce qui implique des pressions partielles de vapeur faibles également.

L'évaporation osmotique est un procédé qui permet d'extraire l'eau d'une solution aqueuse diluée, de manière préférentielle par rapport aux autres molécules volatiles (121). Cette caractéristique rend le procédé d'évaporation osmotique particulièrement intéressant pour la concentration des jus de fruits tropicaux caractérisés à la fois par leur richesse en composés aromatique et par leur fragilité lorsqu'ils sont soumis à des températures élevées ou mêmes modérées.

Cependant le procédé d'évaporation osmotique ne peut être utilisé que pour traiter des solutions aqueuses suffisamment diluées (tension superficielle élevée) pour empêcher le mouillage de la membrane hydrophobe (120, 134). Les faibles densités de flux évaporatoire obtenus et la gestion des solutions extractantes sont les deux principaux freins au développement industriel de procédé.

5-4- Applications

La première application du procédé d'évaporation osmotique concernait la concentration de jus de raisin destiné à la production de vin (121). Beaucoup d'études ont été réalisées pour optimiser les conditions opératoires du procédé en vue d'applications industrielles (109, 110, 128, 150, 151). Bien que moins développées dans la littérature, d'autres types d'applications de l'évaporation osmotique sont mentionnées par divers auteurs. Elle a ainsi été proposée pour pré-concentrer des solutions biologiques thermosensibles avant séchage. Cette configuration permet en effet de réduire la consommation énergétique lors de l'étape de séchage tout en préservant la qualité du produit. Les produits traités selon ce schéma se réfèrent principalement à des applications pharmaco-cosmétiques et alimentaires : lait, café, concentrés protéiques, préparation enzymatiques, pigments naturels, vitamines, etc. (110, 121, 149). L'évaporation osmotique a été également utilisée pour la désalcoolisation du vin (121, 152).

Jusqu'à présent, les travaux les plus aboutis du procédé concernent principalement la concentration de quelques jus de fruits sur des pilotes de laboratoire. Les jus de fruit sont généralement concentrés après avoir été clarifiés par filtration. Ainsi, le **tableau 17** propose un inventaire de l'ensemble des applications du procédé d'évaporation osmotique sur les jus de fruits.

L'analyse du tableau 17 montre que les modules équipés de membranes fibres creuses en polypropylène sont les plus utilisés pour concentrer les jus de fruits notamment tropicaux. Le chlorure de calcium à des concentrations de 4,5 à 6,0 mol.L⁻¹ est la solution extractante la plus employée. Quelques rares applications ont été effectuées sur des pilotes semi-industriels dotés d'une surface membranaire de 10 m² (6, 7). Les applications sur des extraits végétaux sont quasi inexistantes malgré les potentialités de cette technique pour conserver les molécules actives telles que les composés anthocyaniques et autres polyphénols contenus dans ces extraits.

Tableau 17. Exemples d'application de l'évaporation osmotique aux jus de fruit.

Produits	Caractéristiques membrane	Conditions opératoires	ESS _i /ESS _f (g.100g ⁻¹)	Flux évaporatoire (kg.h ⁻¹ .m ⁻²)	Références
Jus d'orange		T _j = 29,4 °C	10,3/41,5	0,43	(153)
	Polypropylène, fibres creuses	[CaCl ₂] = 4,6 M			
	Diamètre pore : 0,2 µm ; épaisseur : 800 µm	T _s = 30,7 °C	10,3/52,5	0,43	(153)
		[CaCl ₂] = 4,6 M			
	Porosité : 75 %	T _j = 26 °C ; T _s = 30-33 °C	11,5/45	0,70/0,67	(6)
	Surface : 10,3 m ²	[CaCl ₂] = 5,5 M	45/62	0,67/0,59	
		U _s = 0,02 m.s ⁻¹ , U _j = 0,20 m.s ⁻¹	11,5/62	0,65	
Jus de fruit de la passion	Polyéthylène, fibres creuses	T = 26 °C	10,0/60,0	1,40/0,48	(154)
	Diamètre pore : 0,03 µm	[CaCl ₂] = 4,1-4,5 M			
	Porosité : 40 %	ΔP = 13 kPa			
	Surface : 1,4 m ²	Q _s = 69 L.h ⁻¹ , Q _j = 28 L.h ⁻¹			
Jus de kiwi	Polypropylène, fibres creuses	T _j = 30,4 °C	14,0/65,5	0,43	(153)
	Diamètre pore : 0,2 µm ; épaisseur : 800 µm	[CaCl ₂] = 4,6 M			
	Porosité : 75 %	T _j = 28 °C ; T _s = 28 °C	14/40	0,65	(142)
	Surface : 10,3 m ²	[CaCl ₂] = 5,3 M	40/60	0,50	
		U _s = 0,002 m.s ⁻¹ , U _j = 0,24 m.s ⁻¹	14/60	0,57	
Jus de kiwi	Polypropylène, fibres creuses	T _j = 25 °C	9,4/61,4	1,00/ 0,73/ 0,47	(155)
	Surface : 1,4 m ²	[CaCl ₂] = 4,1 M		1,16/0,35	(144)
		ΔP = 28 kPa	25/63,4	12,4/5,8	
		Q _s = 30 L.h ⁻¹ , Q _j = 28 L.h ⁻¹			

T_j et T_s respectivement température du jus et de la saumure ; Q_j et Q_s débits respectifs de jus et saumure ; U_j et U_s débits de jus et saumure

Tableau 17 (Suite 1). Exemples d'application de l'évaporation osmotique.

Produits	Caractéristiques membrane	Conditions opératoires	ESS _i /ESS _f (g.100g ⁻¹)	Flux évaporatoire (kg.h ⁻¹ .m ⁻²)	Références
Jus de citron	Polyéthylène, fibres creuses Diamètre pore : 0,03 µm Porosité : 40 % Surface : 1,4 m ²	T = 26 °C [CaCl ₂] = 4,1-4,5 M ΔP = 13 kPa Q _s = 69 L.h ⁻¹ , Q _j = 28 L.h ⁻¹	13,6/63,0	1,60/0,20	(154)
Jus de melon	Polypropylène, fibres creuses Diamètre pore : 0,2 µm ; épaisseur : 800 µm Porosité : 75 % Surface : 10,3 m ²	T _j = 26 °C ; T _s = 31 °C [CaCl ₂] = 5,3-5,6 M U _s = 0,02 m.s ⁻¹ , U _j = 0,2 m.s ⁻¹	7,0/55,0	0,70/0,63/0,57	(7)
Jus de camu-camu	PTFE, plane Diamètre pore : 0,2 µm ; épaisseur : 60 µm Porosité : 80 % Surface : 0,003 m ²	T _j = 35 °C ; T _s = 20 °C [CaCl ₂] = 5,2 M U _s = 2 m.s ⁻¹ , U _j = 1,25 m.s ⁻¹	6,6/24,7 25/63,4	13,3/11,1 12,4/5,8	(156)
Jus d'ananas	PTFE, plane asymétrique, épaisseur 60 µm Diamètre pore : 0,2 µm Porosité : 80 % Surface : 0,004 m ²	T _j = 35 °C ; T _s = 20 °C [CaCl ₂] = 5,5-6,0 M U _s = 2 m.s ⁻¹ U _j = 1,25 m.s ⁻¹	10,6/27,8 30,2/55,5	10 7	(145)
Jus de pomme	Polypropylène, tubulaire, épaisseur 1500 µm Diamètre pore : 0,2 µm Porosité : 70 % Surface : 0,036 m ²	T _j = 35-45 °C ; T _s = 25 °C [CaCl ₂] = 3,5-6,0 M	-/62	0,30	(157)

T_j et T_s respectivement température du jus et de la saumure ; Q_j et Q_s débits respectifs de jus et saumure ; U_j et U_s débits de jus et saumure

Tableau 17 (Suite 2). Exemples d'application de l'évaporation osmotique.

Produits	Caractéristiques membrane	Conditions opératoires	ESS _i /ESS _f (g.100g ⁻¹)	Flux évaporatoire (kg.h ⁻¹ .m ⁻²)	Références
Jus de carotte	Polyéthylène, fibres creuses Diamètre pore : 0,03 µm Porosité : 40 % Surface : 1,4 m ²	T = 26 °C [CaCl ₂] = 4,1-4,5 M ΔP = 13 kPa Q _s = 69 L.h ⁻¹ , Q _j = 28 L.h ⁻¹	13,6/63,0	1,40/0,10	(154)
Jus de lime doux	Polypropylène, plane, Diamètre pore : 0,2 µm Surface : 0,012 m ²	T _j = 25 °C ; T _s = 25 °C [CaCl ₂] = 10 M U _s = 0,94-3,75 x10 ⁻³ m.s ⁻¹ U _j = 0,12-4,50 x10 ⁻² m.s ⁻¹	5/55	2,23/1,26	(158)
Jus de noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	Polypropylène, fibres creuses Diamètre pore : 0,3 µm Porosité : 40 % Surface : 0,58 m ²	T _j = 30 °C ; T _s = 30 °C [CaCl ₂] = 2,0-6,0 M U _s = 6-60 L.h ⁻¹ U _j = 6-60 L.h ⁻¹	8/32	0,09/0,41	(146)
Extrait de colorant phycocyanine	Polypropylène, plane, Diamètre pore : 0,2 µm Surface : 0,012 m ²	T _j = 25 °C ; T _s = 25 °C [CaCl ₂] = 10 M U _s = 0,94-3,75 x10 ⁻³ m.s ⁻¹ U _j = 0,12-4,50 x10 ⁻² m.s ⁻¹	0,5 -1,5 mg.L ⁻¹	2,25/1,80	(158)
Purée de tomate	PTFE, plane asymétrique, épaisseur 8,5 µm Diamètre pore : 0,2 µm Porosité : 78 % Surface : 0,002 m ²	T _j = 20-24 °C ; T _s = 20-24 °C [NaCl] = 4,8 M U _s = 30 L.h ⁻¹ U _j = 30 L.h ⁻¹	6,0/21,8	1,25/0,70	(159)

T_j et T_s respectivement température du jus et de la saumure ; Q_j et Q_s débits respectifs de jus et saumure ; U_j et U_s débits de jus et saumure

Matériel et Méthodes

1- Matériel végétal et préparation des extraits

Deux variétés d'*Hibiscus sabdariffa* cultivées dans le village de Thiaré situé dans la région de Kaolack au centre du Sénégal et dans la région de Louga au nord, ont été utilisées au cours de ces travaux. Il s'agit des variétés THAI et VIMTO récoltées entre 2007 et 2010. Après récoltes, les calices ont été manuellement décortiqués et séchés au soleil sur des claies en hauteur pendant 5 à 10 jours. Après séchage, les calices sont conditionnés en ballots de 50 kg dans des sacs en propylène et acheminés vers Dakar par la route.

Les extraits d'*Hibiscus sabdariffa* ont été préparés en utilisant de l'eau déminéralisée selon un ratio calice/eau (kg/kg) déterminé. Un broyage manuel à l'aide d'un mortier est effectué dans certains cas. Le broyage est suivi d'un tamisage pour standardiser la taille. L'extraction est réalisée à une température et pendant une durée déterminée. En fonction de la durée d'extraction (10 min à 10 h), une agitation manuelle est effectuée toutes les 5, 10, 15, 30 et 60 min.

2- Caractérisation des calices, extraits et concentrés

Les méthodes d'analyses physico-chimiques classiques utilisées pour caractériser les calices, extraits et les différents produits obtenus sont résumées dans le **tableau 1**. Seules les méthodes analytiques spécifiques sont décrites en détails ci-dessous.

2-1- Dosage de la vitamine C par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Le principe de la méthode de dosage de la vitamine C est basé sur la réduction de l'acide déhydroascorbique en acide ascorbique par le DL-dithiothréitol (DDT) en tant qu'agent réducteur (160). Une quantité de 2 mL d'extrait de bissap est homogénéisée avec 8 mL de solution d'extraction (acide métaphosphorique à 4,5 % dans de l'eau distillée). L'ensemble est centrifugé puis le surnageant prélevé est filtré sur filtre millipore 0,45 μm . Un mL de surnageant est ajouté à 0,2 mL d'une solution de DTT à 20 mg.mL^{-1} pendant 2 h et 20 μL est injecté en CLHP. Les analyses CLHP ont été réalisées avec un système Agilent 1100 équipé d'un détecteur à barrette de diodes. La séparation est effectuée sur une colonne RP18e Licrospher 100 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm , Merck KgaA). La phase mobile est constituée d'une solution d'acide sulfurique à 0,01 % à un pH de 2,5 (système d'élution isocratique). Le début de la phase mobile est réglé à 1 mL.min^{-1} et les échantillons sont injectés via une vanne Rhéodyne, équipée d'une boucle de 20 μL . La longueur d'onde de détection est fixée à 245 nm. Un étalonnage externe comportant 5 concentrations d'acide ascorbique (20 à 100 mg.L^{-1}) a été réalisé et utilisée pour la quantification.

Tableau 1. Analyses physico-chimiques classiques effectuées sur les calices et extraits d'*Hibiscus sabdariffa*, jus de raisin et jus de pomme

Analyses	Notation	Unité	Méthode	Matériel	Précision
pH	pH	Unité pH	pH métrie	pH mètre (ORION modèle 601 A) avec correction de température	0,05 unité pH
Acidité titrable	AT	meq.l ⁻¹	Tritimétrie (NF V05-101)	NaOH 0,1N avec phénophtaléine comme indicateur coloré	
Extrait sec soluble	ESS	g.100g ⁻¹	Réfractométrie (NF V05-109)	Réfractomètre type Abbe ATAGO avec lecteur digital et correction de température	0,2 g.100g ⁻¹
Activité en eau	Aw		Aw-mètre	Aw-mètre AGUA LAB CX-2 et AquaLab 4TE calibre sur eau pure et solution NaCl saturée à 35°C	0,005
Densité	ρ	Kg.m-3	Pesée de 25 ml de jus (moyenne sur 3 mesures)	Fiole jaugé de 25 ml, balance de précision METTLER AE 200	3 kg.m ⁻³
Conductivité	S	mS.cm-1	Conductimétrie à 25 °C	Conductimètre HANNA INSTRUMENTS HI 18733 calibré sur solutions standard à 1413 et 17880 μS.cm ⁻¹	0,5
Couleur	Lab	Unités Lab	Colorimètre	Colorimètre Hunter Lab DP 9600 calibré avec couleur noire puis blanche	
Viscosité	μ	mPa.s	Viscosimètre	Viscosimètre capillaire OSTWALD et viscosimètre SEARLE Haake VT 550 dans bain thermostaté à 35°C	0,2 mPa.s
Solides insolubles en suspension	SIS	g.100g ⁻¹	Centrifugeuse SYGMA 2-15	Centrifugation à 3000 g pendant 15 min, puis pesée du culot après égouttage	1 g.100g ⁻¹
Matière grasse	MG	g.100g ⁻¹	Méthode SOXTEC, CIRAD	Extraction à l'éther de pétrole puis pesée de la quantité de matière grasse extraite	0,05 g.100g ⁻¹

2-2- Dosage des polyphénols totaux

Un demi-gramme de poudre de calices d'*Hibiscus sabdariffa* ou 3 g de jus ou d'extrait sont utilisés selon le cas pour effectuer le dosage des polyphénols totaux. L'échantillon est extrait par 10 ml d'un mélange acétone/eau/acide formique (70/28/2 : v/v/v) durant 10 minutes. L'opération est répétée deux fois. Les deux fractions sont rassemblées et filtrées sur papier filtre. Le dosage est effectué à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode mise au point par Georgé *et al.* (161). Cinq μL de filtrat sont complétés à 500 μL avec du méthanol puis dosés avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Parallèlement, 500 μL de filtrat sont additionnés à 3500 μL d'eau et 2 mL de ce mélange sont déposés sur une cartouche OASIS puis lavés avec deux fois 2 mL d'eau. Le volume de la fraction éluée est mesuré et 500 μL de cette fraction sont ensuite dosés. Les absorbances sont mesurées à 760 nm par un spectrophotomètre UV 7200 (CECIL INSTRUMENTS, Royaume Uni). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents acide gallique pour 100 g de matière sèche et sont la moyenne de trois essais.

2-3- Dosage des anthocyanes totaux

Le principe est basé sur la modification de la coloration des anthocyanes en fonction du pH (méthode pH-différentielle) (162). Jimenez *et al.*, (163) ont montré que cette méthode simple et rapide de dosage des anthocyanes totaux est parfaitement corrélée à la méthode de dosage par CLHP. Après dilution de l'extrait de bissap dans deux solutions tampon à pH 1,0 et pH 4,5, l'absorbance est mesurée à 500 et à 700 nm. Les valeurs lues aux deux longueurs d'ondes pour chaque dilution permettent de calculer la concentration en anthocyane par l'équation 1.

$$C_a = \frac{(M * A * F_d * 1000)}{\epsilon} \quad (1)$$

où, C_a est la concentration en anthocyanes en mg.L^{-1} , M la masse molaire de l'anthocyane majoritaire le sambubioside de delphinidine (597 g.mol^{-1}) dans les calices de bissap, F_d le facteur de dilution de l'échantillon, ϵ coefficient d'extinction moléculaire égal à $26\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et A absorbance calculée grâce à l'équation 2.

$$A = (A_1 - A_2) - (A_3 - A_4) \quad (2)$$

avec A_1 absorbance mesurée à pH 1 à 510 nm, A_2 absorbance mesurée à pH 1 à 700 nm A_3 absorbance mesurée à pH 4,5 à 510 nm et A_4 absorbance mesurée à pH 4,5 à 700 nm.

2-4- Détermination du pouvoir antioxydant par la méthode ORAC

La mesure du pouvoir antioxydant par la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) est basée sur la détection de la chute de fluorescence de la fluorescéine (FL), due à sa réaction avec le radical peroxy $\text{ROO}\bullet$, dans une matrice alimentaire contenant des composés antioxydants. Plus l'activité antioxydante est élevée, plus lente sera la chute de fluorescence. L'effet protecteur des antioxydants est évalué en mesurant l'aire sous la courbe de décroissance de la concentration de la fluorescéine.

Les essais ont été réalisés selon la méthode développée par Ou et al. (2001) (164), et utilisée par Gancel et al. (2008) (165), à l'aide d'un spectrofluorimètre à plaques (Infinite 2000, TECAN, Salzborg, Autriche). Toutes les solutions ont été préparées dans du tampon phosphate 75 mM (pH = 7,4). Chaque puits a été rempli avec 160 μL de solution de fluorescéine (FL) 78,75 nM et 20 μL de tampon pour la solution témoin, de solution standard de Trolox pour la réalisation de la courbe d'étalonnage (gamme 0-40 μM) ou d'échantillon. La plaque est incubée à 37 °C durant 15 min avant d'introduire 20 μL d'une solution de 2-2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorure (AAPH) 178 mM (WAKO Chemicals, Richmond, USA). Les solutions de fluorescéine et de Trolox sont préparées extemporanément et conservées à 4°C dans l'obscurité. La solution d'AAPH est également préparée le jour même. Après addition de l'AAPH, la fluorescence est mesurée chaque minute durant une heure. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 485 ± 9 nm et 520 ± 20 nm.

Les valeurs ORAC sont calculées en utilisant une équation de régression entre la concentration de Trolox et l'aire nette sous la courbe de décroissance de la fluorescence. L'aire sous la courbe (AUC) et l'aire nette (AUC net) sont déterminées en utilisant les deux équations (3,4):

$$\text{AUC} = 0,5 + \frac{1}{f_0} \sum_{t=1}^{59 \text{ min}} f_t \quad (3)$$

Dans laquelle f_0 et f_t représentent respectivement la fluorescence initiale et celle lue au temps t.

$$\text{AUC net (extrait)} = \text{AUC (extrait)} - \text{AUC (blanc)} \quad (4)$$

La valeur relative ORAC, exprimée en micromoles équivalents Trolox par gramme de matière fraîche ($\mu\text{M TE/g MF}$) est calculée à partir de l'équation (5):

$$\text{ORAC} = \frac{[\text{AUC (trolox)} - \text{AUC (blanc)}]}{[\text{AUC (extrait)} - \text{AUC (blanc)}]} \quad (5)$$

où $[\text{AUC (trolox)} - \text{AUC (blanc)}]$ représente la concentration de l'échantillon et $[\text{AUC (extrait)} - \text{AUC (blanc)}]$ la concentration en Trolox.

Les valeurs ORAC sont exprimées en micromoles équivalents Trolox par gramme de matière fraîche.

2-5- Dosage des acides organiques

Les acides organiques sont extraits en milieux aqueux par une solution d'acide sulfurique à 0,005 M. Les calices d'*Hibiscus sabdariffa* sont préalablement broyés mécaniquement. 150 mg de poudre sont ensuite mis en contact avec 1,5 ml d'acide sulfurique à 0,005 M dans un tube Eppendorf bouché hermétiquement. Le tube est ensuite agité vigoureusement et placé sous agitation sur une couronne tournante pendant 30 min à température ambiante. A l'issue des 30 min, une centrifugation à 4140 g durant 5 min à 20 °C est effectuée.

La séparation est effectuée par CLHP sur une colonne Aminex H+ Biorad (300 mm x 7,8 mm). La détection est réalisée par couplage d'un détecteur UV (210 nm) et réfractométrique. L'élution est effectuée à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 0,005 mol.L⁻¹ à un débit de 1 mL.min⁻¹. Le volume d'injection est de 20 µL.

2-6- Dosage des sucres

Les sucres en milieu fortement basique (pH > 12) se comportent comme des acides faibles (pKa entre 12 et 14). Ionisés, ils peuvent être séparés par échange d'anions. La détection par ampérométrie basée sur la mesure du courant d'oxydation des sucres à un potentiel déterminé, présente une spécificité liée à la réaction électrochimique des groupements d'alcools secondaires.

Les extraits d'*Hibiscus sabdariffa* récupérés ont été dilués, filtrés à 0,45 µm puis injectés dans un appareil de chromatographie liquide haute performance DX600 (DIONEX Corp., Sunnyvale, USA) équipé d'une colonne Carbowpac MA-1 et d'un détecteur à ampérométrie pulsée ED40. L'éluant est de la soude 600 mM ou 800 mM à un débit de 0,4 mL.min⁻¹. Le programme d'élution comprend 10 min de soude 800mM suivi d'un gradient de 800 à 600 mM pendant 10 min, puis retour à 800 mM pendant 10 min, enfin un pallier de 10 min à 800 mM. La teneur en sucres est exprimée en g pour 100g de matière fraîche ou sèche. Dans le cas des calices, une étape d'extraction des sucres par l'éthanol à 80 % pendant 30 min à une température de 80°C, est préalablement réalisée.

2-7- Analyses des éléments minéraux des calices d'*Hibiscus sabdariffa*

La détermination des éléments minéraux présents dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa* a été effectuée par le laboratoire d'analyse US49 du CIRAD. La méthode comprend trois étapes à

savoir la mise en solution par minéralisation, le dosage des éléments minéraux et la détermination de la teneur en azote total.

En éliminant la matière organique et la silice des échantillons, la minéralisation permet de mettre en solution, en vue de leur dosage, un grand nombre d'éléments minéraux. Pour ce faire, 500 mg de matériel végétal préalablement séché sont introduits dans une capsule en platine. La capsule est placée dans un four dont la température est progressivement augmentée jusqu'à 500°C puis maintenue ainsi pendant 2 heures. Un pallier est effectué aux alentours de 200°C jusqu'à la fin du dégagement de fumées. Après refroidissement, les cendres sont humectées avec quelques gouttes d'eau puis 2 ml de HCl 6 N sont ajoutés. Après évaporation à sec, 2 ml de HCl 6 N sont rajoutés à nouveau. L'ensemble est laissé en contact 10 minutes puis filtré dans une fiole jaugée de 50 ml. Le filtre contenant le résidu est alors calciné à 500°C. 1 à 2 ml d'acide fluorhydrique sont alors ajoutés sur les cendres puis évaporés sur plaque chauffante. La silice contenue dans les cendres est ainsi volatilisée sous forme de SiF_6 . Le résidu est repris par 1 ml de HCl 6 N puis filtré dans la même fiole de 50 ml. Après avoir ajusté avec de l'eau au trait de jauge, la solution est homogénéisée par agitation.

Le dosage des éléments minéraux est ensuite réalisé par spectrométrie d'émission plasma à couplage inductif (ICP). La solution précédente est analysée par un spectromètre VARIAN VISTA (Victoria, Australie), équipé d'un détecteur CCD (Coupled Charged Device) permettant la détermination simultanée, à plusieurs longueurs d'onde, de tous les éléments de la classification périodique des éléments à l'exception des corps gazeux. Les dosages sont effectués en réalisant un étalonnage respectant les conditions du milieu analysé : matrice, acidité. La validation des résultats repose sur l'analyse d'échantillons références dont la teneur en éléments minéraux est connue. Ces témoins suivent rigoureusement le même cheminement analytique que les échantillons et sont introduits à raison de un témoin minimum pour 20 échantillons.

2-8- Détermination de la teneur en azote total

La méthode de DUMAS est utilisée. Une prise d'essai de chaque échantillon préalablement broyé puis homogénéisé (de 50 à 150 mg selon le type d'échantillon) est pesée sur une feuille d'étain puis introduite dans un four à environ 850°C dans un flux d'oxygène. Les gaz de combustion subissent une série de piégeages afin d'éliminer les poussières, les halogènes, les oxydes de carbone ainsi que la vapeur d'eau. Une réduction sur colonne de cuivre à 730°C permet ensuite de réduire les oxydes d'azote en gaz N_2 . La teneur en azote est déterminée par une cellule thermoélectrique (catharométrie), préalablement calibrée avec des substances de composition en azote connue (acide éthylène diamine tétraacétique, glycine).

2-9- Détermination du matériel insoluble dans l'alcool

La méthode de préparation est basée sur l'insolubilité des constituants polyosidiques pariétaux dans l'éthanol à 80 % (v/v) (166). Cent g de d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* sont mélangés dans 400 mL d'éthanol bouillant durant 30 min sous agitation. Le mélange est filtrée sous vide et successivement lavée avec 500 mL d'un mélange éthanol/eau (80/20 : v/v), 200 mL d'éthanol, 200 mL d'acétone puis 100 mL d'éther. Quand l'éther s'est évaporé, le résidu est séché à température ambiante pendant 2 à 3 h. Le résidu est ensuite placé à l'étuve sous vide à une température de 70 °C pendant 24 h.

2-10- Analyses des composés d'arôme par SPME

La micro-extraction sur phase solide (SPME) est une méthode d'analyse des composés volatils, qui n'utilise pas de solvant organique et ne nécessite qu'un très faible volume d'échantillon. Elle se décompose en deux étapes. La première étape, d'extraction, consiste en un équilibre de partage entre une phase solide (fibre recouverte d'un revêtement polymère) et une phase gazeuse ou liquide. Une fois les solutés adsorbés, ils sont alors désorbés thermiquement, directement dans l'injecteur du chromatographe. Ce système permet une analyse à la fois qualitative et quantitative. L'analyse des composés d'arôme des extraits d'*Hibiscus sabdariffa* et des jus fruits étudiés est réalisée en utilisant la technique de micro-extraction en phase solide par espace de tête (HS-SPME).

2-10-1- Préparation des échantillons et extraction

Dans un tube de 10 mL, nous introduisons 5 mL d'extrait ou de jus de fruits. Afin de réaliser une quantification des composés extraits, nous rajoutons 5 µL de 4-méthyl 1 pentanol (Sigma, Steinheim, Germany) dilué à 1/1000 comme étalon interne. La fibre utilisée est une fibre SPME en polydiméthylsiloxane-divinylbenzène (PDMS-DVB, 65 µm). Avant la première utilisation, La fibre est pré-conditionnée à la température de 250°C pendant 30 min afin de relarguer les éventuelles impuretés qui auraient pu s'y adsorber. Les différents paramètres d'analyse tels que le temps et la température d'extraction et de désorption, la vitesse d'agitation ont été préalablement optimisés.

Une fois le paramétrage effectué, l'échantillon est incubé dans un four sous agitation à 250 tours.min⁻¹ pendant une durée de 30 min avant que la fibre ne vienne percer le septum et adsorber les composés présents dans l'espace de tête. Une fois l'extraction terminée, les composés sont désorbés de la fibre dans un injecteur chauffé à haute température et analysés par GC-MS.

2-10-2- Analyse GC-MS

L'analyse des composés d'arômes contenus dans les extraits d'*Hibiscus sabdariffa* et les jus de fruits a été réalisée à l'aide d'un chromatographe de type Agilent 6890N en mode injection automatique sur une colonne polaire capillaire DBWAX J&W 122-7032 de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne et de 0,25 μm d'épaisseur de film (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium à un débit de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La température de l'injecteur est de 250°C. Deux μL de chaque échantillon ont été injectés avec la programmation suivante : une augmentation de la température de 3°C.min⁻¹ de 40 à 170 °C suivi d'une de 10 °C.min⁻¹ de 170 à 240 °C. Le chromatographe est couplé à un spectromètre de masse Agilent 5973 Network fonctionnant en mode impacte électronique avec source d'ionisation interne de 70 eV. L'analyseur est de type quadripôle (T = 150 °C), et la température de la source est de 230 °C. L'analyse des fragments a été réalisée en mode scan de 40 à 400 uma à raison de 4,58 umas⁻¹ et ne débute que 5 min après l'injection de notre échantillon.

2-10-3- Identifications des composés volatils

Les composés ont été identifiés par comparaison avec les bases de données des spectres de composés connus Wiley275 ou NIST (version 2002). De plus, l'identité des composés a été confirmée par le calcul des indices de rétention linéaire ou indices de Kovats (IK) et leur comparaison avec ceux trouvés dans la littérature. Ces indices de rétention linéaire ont été calculés (Équation 6) après analyse, dans les mêmes conditions de chromatographie, de la série des n-alcanes C8-C20 (Supelco, Bellefonte, USA).

$$IK = (100 \times n) + 100 \times \frac{(T_{r_i} - T_{r_n})}{(T_{r_{n-1}} - T_{r_n})} \quad (6)$$

avec, T_{r_i} , temps de rétention du composé d'arôme i, T_{r_n} temps de rétention de l'alcane à n carbones, $T_{r_{n-1}}$, temps de rétention de l'alcane suivant.

2-10-4- Quantification des composés volatils

Pour comparer l'effet des différents procédés de concentration (évaporation osmotique, évaporation sous vide) sur les composés d'arôme extraits présents dans les extraits d'*Hibiscus sabdariffa* et dans les jus de fruits (pomme et raisin), nous allons utiliser la méthode de l'étalon interne. En connaissant la quantité d'étalon interne rajoutée à nos échantillons et sachant l'aire que cette masse représente, il est possible à partir des aires des pics des composés, d'accéder à leur masse dans l'échantillon par l'équation (7).

$$\frac{m_i}{m_e} = \frac{C_i}{C_e} = \frac{A_i}{A_e} \times \frac{K_i}{K_e} \quad (7)$$

Avec, m_i et m_e sont respectivement les masses du constituants i et de l'étalon interne, C_i et C_e sont les concentrations du constituant i et de l'étalon interne, A_i et A_e les aires de pic du constituant i et de l'étalon interne et K_i et K_e les coefficients de réponse du composé d'arôme i et de l'étalon interne.

Pour mieux évaluer l'effet du processus de concentration sur le produit initial, nous avons déterminé la distance aromatique (DA) entre le produit final et le produit initial dans un espace aromatique à n dimensions en utilisant l'équation (8).

$$DA = \sqrt{\sum_{i=1}^n (A_1 - A_2)^2} \quad (8)$$

avec A_1 et A_2 aire du composé d'arôme i respectivement avant et après concentration.

2-11- Analyses microbiologiques

Une étude quantitative des germes présents dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa* et dans les extraits a été réalisée. Elle permet d'évaluer la qualité hygiénique des calices venant directement des producteurs d'une part et d'autre part d'appréhender l'effet des différents processus sur la qualité des extraits. La numération a porté sur quelques indicateurs à savoir la flore mésophile aérobie totale, les coliformes totaux et la flore fongique (levures et moisissures).

2-11-1- Principe de dénombrement

La flore mésophile aérobie totale représente le nombre de bactéries banales ou pathogènes qui se développent bien aux températures moyennes. Elle donne une indication intéressante sur l'hygiène des conditions de récolte, de séchage et de stockage des calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Le principe repose sur un ensemencement en profondeur du milieu de culture PCA (plate count agar) des échantillons, et de leurs dilutions décimales sur des paires de boîtes de Pétri qui seront incubées en aérobiose à 30 °C, pendant 72 h.

Les coliformes sont des bactéries d'origine fécale, *a priori* non dangereuses. Leur présence révèle cependant un risque de trouver des microbes pathogènes et révèle un manque d'hygiène en cours de fabrication. La numération des coliformes est effectuée par ensemencement en profondeur du milieu de culture sélectif VRBL (gélose lactosée biliées au cristal violet et au rouge neutre) des échantillons et de leurs dilutions décimales sur paires de boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées en aérobiose à 37 °C pendant 24 h.

Les levures et moisissures sont rarement responsables d'intoxications mais peuvent poser des problèmes de conservation des aliments. Le principe de dénombrement est basé sur l'ensemencement en surface d'un milieu sélectif (Sabouraud chloramphénicol) des

échantillons et de leurs dilutions décimales choisies. L'incubation en aérobiose est faite à 25°C pendant 3, 4, voire 5 jours.

2-11-2- Technique opératoire et méthode de calcul

Les extraits purs de calices rouges de bissap sont d'abord dilués à l'eau peptonée à 10^{-1} , et 10^{-2} . Les extraits purs et leurs différentes dilutions (1 mL) sont ensemencés sur paire de boîte de Pétri. Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation et le moment où le milieu est coulé ne doit pas dépasser 15 min. L'inoculum et le milieu sont mélangés soigneusement puis refroidis. Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve. Pour le milieu Sabouraud on fait un ensemencement en surface, en versant 0,1 mL de l'échantillon que l'on va étaler sur le milieu à l'aide d'un racleur.

Le calcul du nombre de microorganismes (Flore mésophile aérobie totale, coliformes, levures et moisissures) par millilitre d'échantillon à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Pétri choisies est réalisé par l'équation (9) :

$$N = \frac{\sum C_i}{(N_1 + 0,1N_2) \times d} \quad (9)$$

où, $\sum C_i$: la somme des colonies caractéristiques comptées sur toutes les boîtes retenues, N_1 le nombre de boîtes retenues à la première dilution, N_2 le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution et d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution. Les valeurs sont exprimées en UFC.mL⁻¹.

2-12- Analyses sensorielles

Les tests d'analyses sensorielles ont été réalisés avec un jury d'analyse sensoriel composé de 25 personnes. Le jury est non entraîné pour les jus de fruits mais tous les membres sont des consommateurs réguliers de boissons et de produits divers à base de calices d'*Hibiscus sabdariffa*.

Un test triangulaire a été utilisé pour déceler des différences entre les produits. Deux descripteurs à savoir la couleur et l'odeur ont été choisis: Premièrement, pour évaluer l'effet du processus de microfiltration sur la qualité sensorielle, l'extrait obtenu après microfiltration a été comparée avec l'extrait original. En second lieu, pour évaluer l'effet de la température de stockage sur la qualité sensorielle, les extraits conservés à 4, 20 et 37 °C pendant 90 jours ont été comparés entre eux et avec l'extrait original. L'analyse des résultats permet de définir s'il existe des différences entre les échantillons avec un niveau de confiance de 95 %.

3- Optimisation de l'extraction des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*

3-1- Dispositif expérimental

L'extraction standard des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* a été effectuée selon la procédure décrite sur la **figure 1**. Toutefois des modifications ont été apportées dans certains cas. Ainsi pour l'étude des cinétiques d'extraction de 25 à 90 °C le mélange calices/eau est réalisé dans des flacons ambrés de 250 ml et placé dans un bain-marie réglé à une température supérieure de 2°C à celle de la consigne. Un flacon scellé et muni d'un thermomètre est utilisé comme témoin de la température. Les flacons sont régulièrement agités en fonction de la durée d'extraction. A intervalles de temps réguliers, les flacons sont sortis du bain-Marie et immédiatement refroidis avec de l'eau froide jusqu'à 25 °C. Ils sont ensuite filtrés et l'extrait est immédiatement stocké à basse température jusqu'aux analyses. Dans le cas où l'extraction est effectuée à partir des calices broyés, le broyage est réalisé manuellement à l'aide d'un mortier et d'un pilon.

3-2- Exploitation des résultats

Au niveau de chaque extrait, le pH, l'acidité titrable, l'extrait sec soluble et la teneur en anthocyane ont été déterminés. Le rendement d'extraction en anthocyane (R_a) a été considéré comme le critère essentiel pour suivre et comparer les différentes cinétiques d'extraction. Il a été déterminé à partir de l'équation 10

$$R_a = \frac{m_{a/e}}{m_{a/c}} = \frac{C_{a/e}.m_e}{C_{a/c}.m_c} \quad (10)$$

où $m_{a/e}$ et $m_{a/c}$ représentent respectivement les masses d'anthocyane dans l'extrait et dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa*, $C_{a/e}$ et $C_{a/c}$ représentent respectivement les concentrations en anthocyane dans l'extrait et dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa* déterminées en utilisant la méthode du pH-différentiel, m_e et m_c correspondent respectivement aux masses d'extrait et de calices.

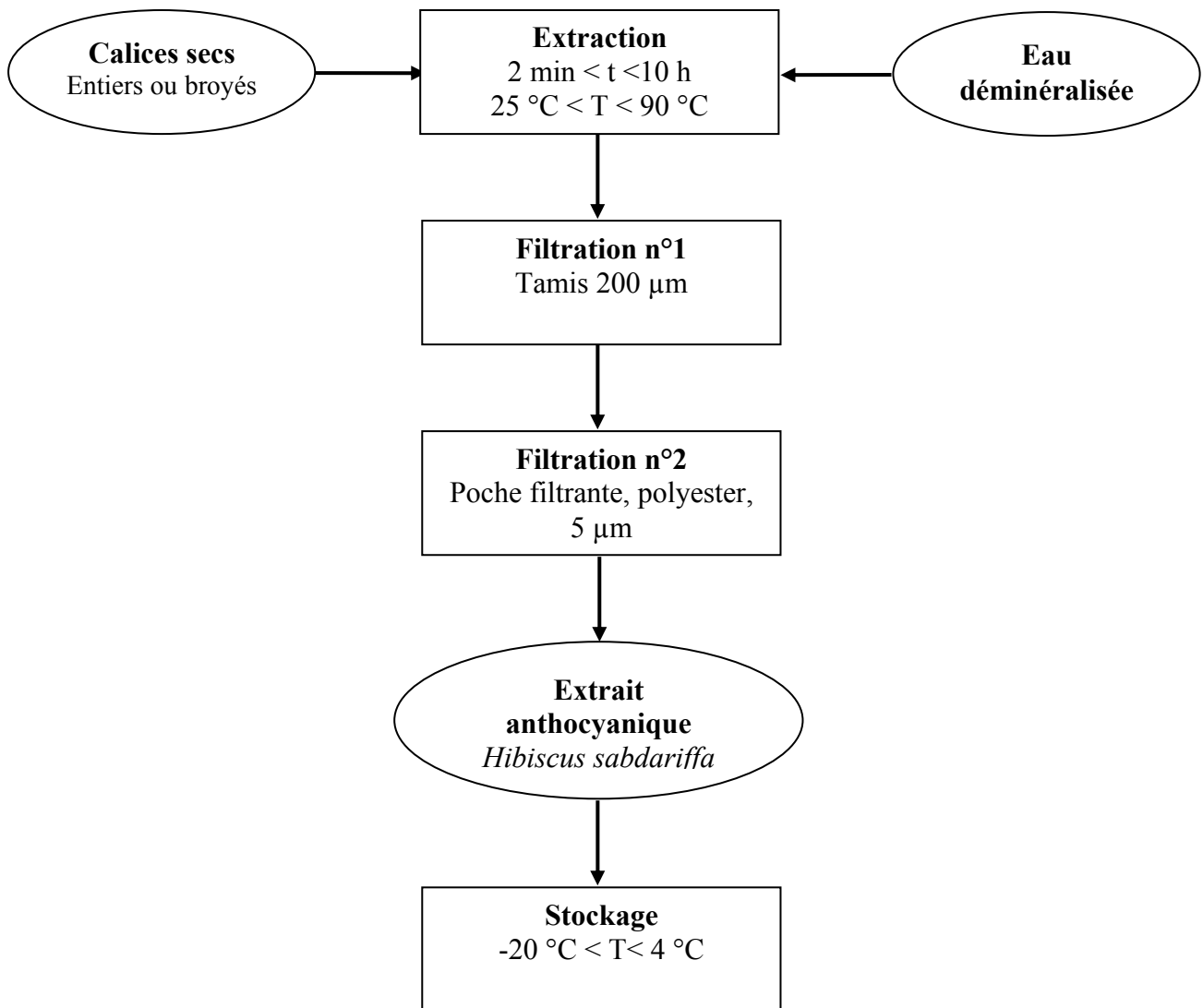


Figure 1. Processus d'obtention des extraits bruts d'*Hibiscus sabdariffa*.

3-3- Modélisation de l'extraction aqueuse des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*

3-3-1-Hypothèses du modèle

- La particule solide d'*Hibiscus sabdariffa* est une forme de sphérique avec une concentration en anthocyane uniforme C_S^0 .
- La concentration en anthocyane à l'intérieur du solide ne dépend que de sa position et du temps ($C_S(r, t)$).
- Le solvant est parfaitement agité et la résistance au transfert entre les phases solide et liquide est supposée négligeable. Ainsi, la concentration en anthocyane dans le solvant ne dépend que du temps ($C_L(t)$).

- La concentration en anthocyane à l'interface liquide-solide est égale à la concentration en anthocyane à l'interface solide-liquide
- L'effet cumulatif du temps et de la température sur la dégradation des anthocyanes a été décrit suivant une équation d'ordre 1
- Le transport des anthocyanes a été décrit suivant un mécanisme diffusionnel caractérisé par un coefficient de diffusion (D_{eff}).

3-3-2-Equation générale

Selon les hypothèses de base, le modèle de diffusion de l'extraction solide-liquide a été utilisé en y incluant l'effet de la température sur la dégradation des anthocyanes (équation 11).

$$\frac{\partial C_S(t,r)}{\partial t} + D_{eff} \Delta C_S(t,r) = -k C_S(t,r) \quad (11)$$

Où k est la constante de vitesse (s^{-1}) et déterminé en utilisant la loi d'Arrhenius (équation 12).

$$k = k_{ref} \exp \left[\frac{-E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (12)$$

k_{ref} , E_a et R sont respectivement la constante de vitesse (s^{-1}) à la température de référence (T_{ref}), l'énergie d'activation ($J.mol^{-1}$) et la constante des gaz parfait ($8,312 J.mol^{-1}.K^{-1}$).

Le bilan massique pour le solvant est :

$$V_L \frac{dC(t)}{dt} = J(t) - k C_L(t) \quad (13)$$

avec V le volume du solvant et $J(t)$ le flux d'anthocyane pénétrant le liquide qui est égal au flux d'anthocyane sortant des calices.

3-3-3- Conditions initiales et aux limites

- Conditions initiales

Pour la phase solide à $t=0$:

$$C_S(0,r) = C_S^0 \quad 0 \leq \forall r \leq \frac{e}{2} \quad (14)$$

Pour les conditions initiales à $t = 0$, pour la phase continue $C_a = 0$ (concentration en anthocyane dans l'eau), pour les calices $C_1 = C_a = 1,5 mg.g^{-1}$

Pour le solvant :

$$C_L(0) = 0 \quad (15)$$

- Conditions aux limites

Au centre du solide ($r = 0$)

$$\left. \frac{\partial C_S(r,t)}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad \forall t \quad (16)$$

A l'interface de la particule ($r = \frac{e}{2}$) le flux sortant d'anthocyane est :

$$J(t) = -D_{eff} A \left. \frac{\partial C_{r,t}}{\partial r} \right|_{r=e/2} \quad (17)$$

avec A la surface de la particule.

3-3-4-Paramètres d'entrée

Le coefficient de diffusion efficace (D_{eff}) a été déterminé en utilisant une corrélation empirique (167).

$$D_{eff} = \frac{9,96 \cdot 10^{-16}}{\mu M_i^{1/3}} T \quad (18)$$

avec T (K) la température d'extraction, M_i la masse molaire du composé extrait (delphinidine de sambubioside) et μ (Pa s) viscosité du solvant à la température d'extraction

3-3-5- Résolution numérique

La résolution numérique a été effectuée en utilisant le logiciel Comsol Multiphysics™ (version 3.1, Comsol Inc., Stockholm, Suède).

4- Dégradation thermique et stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*

4-1- Dispositif expérimental

4-1-1- Cas de la dégradation thermique

Le traitement thermique des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* a été étudié à des températures de 25 à 90 °C. Des tubes en pyrex munis de bouchon à vis d'une longueur de 10 cm, d'un diamètre intérieur de 16 mm et d'une épaisseur de 2 mm ont été utilisés. Remplis entièrement avec un extrait d'*Hibiscus sabdariffa* préparé à partir du ratio calice/eau 1/15 (kg.kg⁻¹), les tubes sont immergés dans un bain-marie ou un bain d'huile thermostaté (AM 3001 K, Fischer Bioblock Scientific, Ilkirch, France). Une sonde de température reliée au bain

est scellée dans un des tubes pour contrôler la température durant le traitement thermique avec une précision de $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Les temps nécessaires pour atteindre les températures de consigne et pour refroidir le produit à 25°C après traitement thermique sont compris entre 20 et 120 secondes. Ces temps très faibles nous permettent de considérer que les différents traitements thermiques sont quasiment isothermes. Au cours du traitement thermique d'une durée de 3 à 5 h, les tubes sont prélevés toutes les 30 min et refroidis immédiatement dans un bain de glace fondante à 0°C . Pour chaque couple temps/température, 3 tubes ont été analysés. La concentration en oxygène dissout et la teneur en anthocyane exprimées en mg.L^{-1} ont été déterminées immédiatement après refroidissement.

4-1-2- Cas de l'étude sur la stabilité des anthocyanes

Pour préparer les extraits anthocyaniques d'*Hibiscus sabdariffa*, les calices séchés en provenance du Sénégal de la variété thaïlandaise ont été mélangés à froid ou à chaud avec de l'eau déminéralisée suivant un ratio massique calice/eau de 1/15 (kg.kg^{-1}). L'extrait obtenu est additionné de sorbate de potassium et de benzoate de sodium à des concentrations respectives de 0,09 et 0,07 % dans un but de prévenir le développement microbien au cours du stockage. Dans certains cas, l'extrait subit une étape de traitement thermique (**Tableau 2**) à une température de 90°C pendant 5 min dans un bain-marie thermostaté sans agitation (Memmert, Schwabach, Allemagne). Les différents extraits sont ensuite stockés à 4, 20, 30, 37 et 45°C . Les échantillons sont analysés par rapport au pH, à l'extrait sec soluble, à l'acidité titrable, à la teneur en anthocyane, à la densité de couleur, à l'intensité colorante et à l'indice brun tous les 14 jours pendant 6 mois. Tous les échantillons et mesures ont été effectués en triple.

Table 2. Caractéristiques des différents extraits d'*Hibiscus sabdariffa*

Extraits	Paramètre d'extraction (Température : T_e / temps : t_e)		Traitement thermique (Température : T_p /temps : t_p)	
	T_e (°C)	t_e (min)	t_p (°C)	t_p (min)
E 30	30	240	0	0
E 30-P	30	240	90	5
E 100	100	30	0	0
E 100-P	100	30	90	5

4-2- Exploitation des résultats

Ces études cinétiques sur la dégradation thermique et la stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* sont réalisées pour proposer des modèles capables de prédire l'évolution de la concentration des anthocyanes responsables de la coloration rouge vif des produits préparés à partir des calices d'*Hibiscus sabdariffa*. La vitesse de réaction étant proportionnelle à la concentration, la dégradation des anthocyanes peut être assimilée à une réaction du premier ordre. Trois modèles ont été utilisés. Le premier modèle (modèle d'Arrhenius) est basé sur l'approche classique où l'effet de la température sur la constante de vitesse est décrit par la loi d'Arrhenius. L'équation d'Eyring qui est une construction théorique, basé sur le modèle d'état de transition et utilisé en thermodynamique chimique, constitue le deuxième modèle. Le troisième modèle est décrit par les paramètres de résistance thermique D et z utilisés en alimentaire. Le **tableau 3** résume les équations utilisées lors des calculs pour les trois modèles étudiés.

Tableau 3. Équations utilisées pour modéliser la dégradation et la stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*
(C exprimé en mol.L⁻¹ ou g.L⁻¹, C₀ = concentration au temps 0, et le temps t exprimé en s).

	Modèle d'Arrhenius	Modèle d'Eyring	Modèle de Ball
Fonction du temps (réaction du 1 ^{er} ordre)	$\frac{dC}{dt} = -kC \Rightarrow C = C_0 e^{-kt}$ <p>k = constant de réaction (s⁻¹)</p>		$C = C_0 10^{-\frac{t}{D}}$ <p>D = temps de réduction décimal (s) D = (Ln10)/k</p>
Effet de la température	$k = k_{\infty} e^{-\frac{E_a}{RT}}$ <p>T exprimée en K k_∞ = facteur pré-exponentiel valeur de k à T = ∞ (s⁻¹) E_a = énergie d'activation (J.mol⁻¹) R = constant des gaz parfaits = 8.31 J.mol⁻¹.K⁻¹</p> $\ln k = \ln k_{\infty} - \frac{E_a}{RT}$	$k = \frac{k_B}{h} T \cdot e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}} = \frac{k_B}{h} T \cdot e^{-\frac{\Delta H^*}{RT}} \cdot e^{\frac{\Delta S^*}{R}}$ <p>T exprimée en K ΔG* = enthalpie d'activation libre (J.mol⁻¹) ΔG* = ΔH* - TΔS* ΔH* = enthalpie d'activation (J.mol⁻¹) ΔS* = entropie d'activation (J.mol⁻¹.K⁻¹) k_B = constant de Boltzmann = 1.381·10⁻²³ J.K⁻¹ h = constant de Planck = 6.626·10⁻³⁴ J.s R = constant gaz = 8.31 J.mol⁻¹.K⁻¹</p> $\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{RT}$	$D = D_0 10^{-\frac{T}{z}}$ <p>T exprimée en °C D₀ = valeur de D à T = 0 °C (s) z (°C)</p> $\log_{10} D = \log_{10} D_0 - \frac{T}{z}$
Paramètres du modèle	k _∞ , E _a	ΔS*, ΔH*	D ₀ , z
$\frac{C}{C_0} = f(t, T)$	$e^{-k_{\infty} \int e^{\frac{E_a}{RT}} dt}$	$e^{-\frac{k_B}{h} e^{\frac{\Delta S^*}{R}} \int T e^{\frac{\Delta H^*}{RT}} dt}$	$10^{-\frac{1}{D_0} \int 10^{\frac{T}{z}} dt}$

5- Conduite des essais en microfiltration tangentielle

5-1- Description des équipements

Deux installations ont été mises en œuvre au cours de cette étude : un pilote semi-industriel IMECA (Clermont-l'Hérault, France) et un pilote de laboratoire TIA (Bollène, France).

Le pilote semi-industriel IMECA (**Figure 2**) est équipé d'une cuve d'alimentation d'une capacité maximale de 20 L. Il est connecté à une pompe d'alimentation. La mise en vitesse du produit au sein de la boucle rétentat est assurée par une pompe de circulation. Un échangeur de chaleur tubulaire est inséré dans le circuit pour compenser les échauffements dus aux frottements et à la température extérieure. Il est alimenté par de l'eau du réseau. La mise sous pression de la boucle rétentat est assurée par une vanne de contre pression à membrane. Le débit de circulation est mesuré par un débitmètre ce qui permet de calculer la vitesse tangentielle de circulation dans les canaux de la membrane.

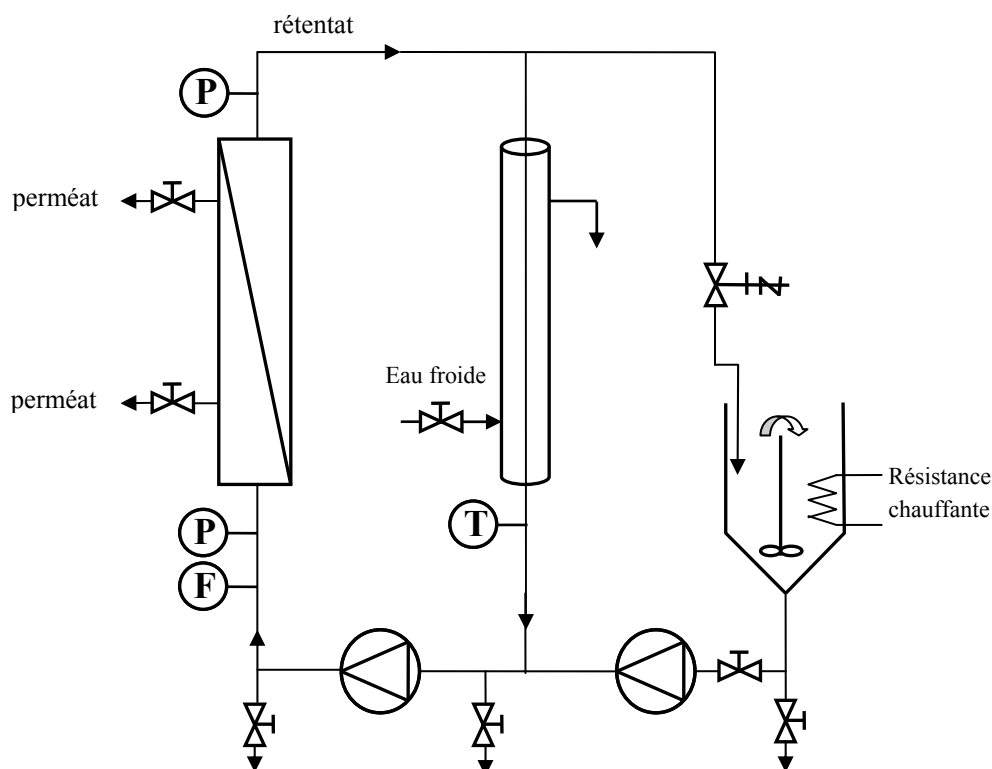


Figure 2. Schéma du pilote semi-industriel de microfiltration tangentielle (IMECA, Clermont- l'Hérault, France)

Le type de membrane installé est une membrane de microfiltration en céramique à profilé multicanal commercialisée sous la dénomination MEMBRALOX 1P19-40 (PALL-EXEKIA, Bazet, France) de diamètre moyen de pores de $0,2 \mu\text{m}$ et de surface filtrante de $0,24 \text{ m}^2$. La membrane est constituée par 19 canaux de 4 mm et la longueur du module est de 100 cm.

Le pilote TIA de laboratoire (**Figure 3**) est muni d'une cuve d'alimentation d'une capacité maximale de 3 litres. Il est équipé de quatre membranes mono-tubulaires de 50 cm² montées en série (MEMBRALOX, PALL-EXEKIA, Bazet, France). Toutes les membranes utilisées présentent un diamètre moyen de pores de 0,2 µm. Le pilote est équipé également d'un échangeur de chaleur et d'une pompe qui permet à la fois d'alimenter l'installation et d'assurer la circulation du fluide dans les modules membranaires.

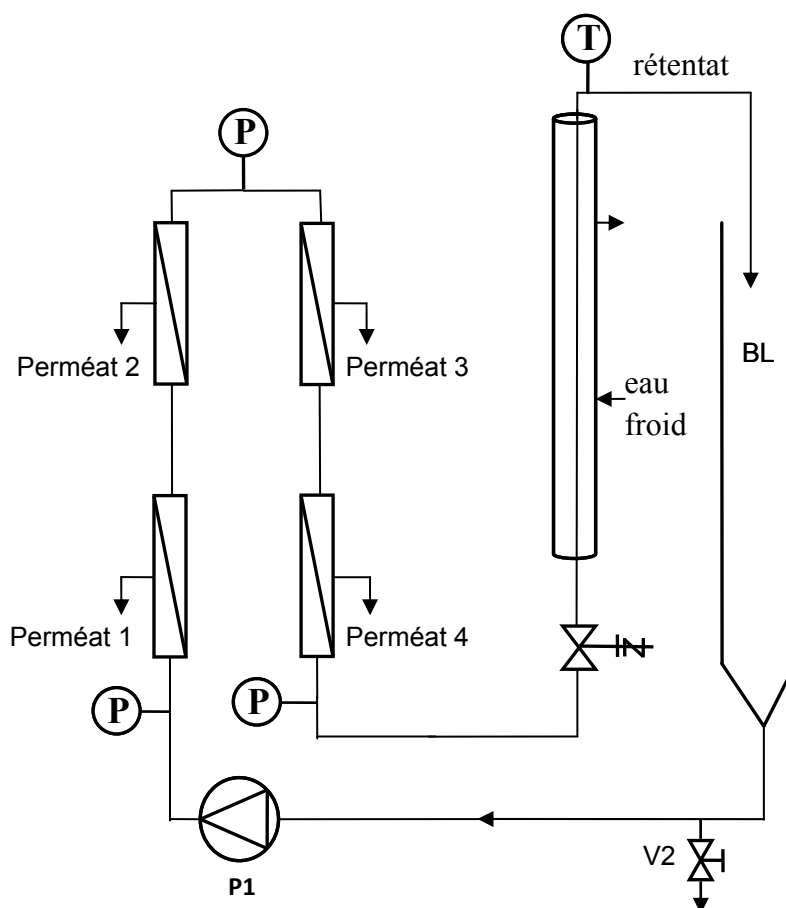


Figure 3. Schéma du pilote de laboratoire de microfiltration tangentielle (TIA)

Chacune de ces installations permet de contrôler les conditions opératoires : vitesse tangentielle ($2,0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1} < U < 6,0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), température ($25 \text{ }^{\circ}\text{C} < T < 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$) et pression transmembranaire ($1,0 \text{ bar} < P_{tm} < 4,0 \text{ bar}$). Le débit de filtrat est mesuré toutes les 5 ou 10 min à l'aide d'une éprouvette et d'un chronomètre à la sortie de chaque module membranaire.

Des prélèvements réguliers de filtrat et de rétentat permettent de suivre l'évolution de leurs caractéristiques physico-chimiques au cours du temps. La fréquence de l'échantillonnage varie de 45 à 60 min. Le volume prélevé est de 10 à 40 ml pour chaque échantillon.

5-2- Modes de conduite des essais

Les essais ont été réalisés avec extraction continue de perméat (facteur de réduction volumique $FRV > 1$) ou en recyclage total ($FRV = 1$). Le facteur de réduction volumique (FRV) est défini comme le rapport entre le volume total de jus ayant alimenté le circuit (V_a) et le volume total de rétentat (V_r).

$$FRV = \frac{V_a}{V_r} = \frac{V_a}{V_a - V_p} \quad (19)$$

où V_p , est le volume total de perméat.

Avec le pilote semi-industriel les essais ont été effectués à FRV croissant tandis qu'avec le pilote de laboratoire, les essais ont été réalisés selon les deux modes de conduite. La conduite sans concentration c'est-à-dire avec recirculation du perméat est utilisée pour l'optimisation des différents paramètres opératoires tels que la vitesse de circulation, la pression transmembranaire, la température. Le recyclage du perméat est effectué en le récupérant dans un béccher à sa sortie et en le reversant à nouveau dans la cuve d'alimentation. Cette opération a été effectuée régulièrement (environ toutes les 2 min) de façon à maintenir le FRV compris entre 1,0 et 1,1.

La conduite en mode concentration avec extraction continue de perméat et alimentation continue en extrait brut d'*Hibiscus sabdariffa* a été réalisée lors des essais à FRV croissant. Après avoir rempli la cuve avec un volume connu d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*, le perméat est recueilli en continu. A intervalle de temps régulier (toutes les 10 min), un volume d'extrait brut correspondant à la quantité total de perméat recueilli au bout des 10 min est rajouté au niveau de la cuve d'alimentation. Cette opération est répétée jusqu'à la fin de l'essai. A la fin des essais de microfiltration tangentielle, les résistances membranaire et de colmatage ont été déterminées en utilisant la loi de Darcy définie par l'équation 20.

$$R_t = \frac{\Delta P}{\mu \cdot J_p} \quad (20)$$

où J_p est le flux de perméat ($m^3 \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$), ΔP est la pression transmembranaire appliquée (Pa), μ la viscosité dynamique du perméat (Pa.s) et R_t la résistance totale (m^{-1}) définie par l'équation 21.

$$R_t = R_c + R_m \quad (21)$$

dans lequel R_m représente la résistance intrinsèque de la membrane et R_c la résistance liée au colmatage.

Afin de relier la densité de flux de perméat (J_p) au FRV, un modèle empirique simple permettant de prédire les flux de perméat a été mis en place et validé (Equation 22).

$$J_p = a - b \cdot \ln FRV \quad (22)$$

où a et b sont déterminés graphiquement en traçant la courbe $J_p = f(\ln FRV)$.

5-3- Conduite de l'essai réalisé pour l'étude de la stabilité de l'extrait microfiltré

Afin d'étudier l'aptitude de la microfiltration tangentielle pour stabiliser à froid les extraits aqueux d'*Hibiscus sabdariffa*, un essai spécifique a été réalisé sur le pilote semi-industriel de microfiltration tangentielle. Le pilote a été d'abord nettoyé selon la procédure définie par Vaillant (166). L'installation a été désinfectée avec une solution de chlore à 150 ppm pendant 45 min puis rincée avec de l'eau déminéralisée préalablement bouillie et refroidie jusqu'à 45 °C. Immédiatement après nettoyage, l'essai avec un extrait brut obtenu à partir du ratio 1/15 a été réalisé en mode concentration avec extraction continue de perméat.

Pendant l'essai, les échantillons ont été prélevés dans des bouteilles en verre préalablement stérilisés à l'autoclave à une température de 121,1°C pendant 30 min. La sortie de perméat a été désinfectée à l'alcool, et stérilisée par une flamme et le remplissage de la bouteille est effectué également sous une flamme.

Les bouteilles ont été ensuite stockées dans une étuve (Mettler, Schwabach, Allemagne) à 37 °C, à 20 °C dans une enceinte ventilée positive (LIEBHERR, Allemagne) à 20 °C et au réfrigérateur (Hoelzle & Chelius HC, Allemagne) à 4 °C. Les échantillons ont été analysés tous les 15 jours pendant 30 jours et puis tous les 30 jours pendant 2 mois.

6- Conduite des essais d'ultrafiltration et de nanofiltration

6-1-Description du pilote

Les essais d'ultrafiltration et de nanofiltration ont été effectués sur une unité pilote de laboratoire (**Figure 4**) équipée d'un module membranaire plane avec une surface efficace de 0.0155 m² (Osmonics Sepa ® CF). Le pilote est équipé d'une cuve d'alimentation à double enveloppe alimentée par un fluide thermostaté avec une capacité maximale de 10 L. Au cours des essais, la température a été fixée et maintenue à 35 ± 1°C en utilisant un bain thermostaté. Une pompe à piston permet d'exercer sur le module membranaire la pression transmembranaire de travail. Des capteurs de pression et de température sont installés sur le pilote. Le flux de perméat est déterminé par pesée de la quantité de perméat. Un système électronique d'acquisition des données permet d'enregistrer toutes les 10 s les valeurs de la

pression transmembranaire appliquée et la masse de perméat recueilli au cours de l'essai. Pour chaque essai, 5 litres d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* à 40 g d'extrait sec soluble.kg⁻¹ ont été utilisés.

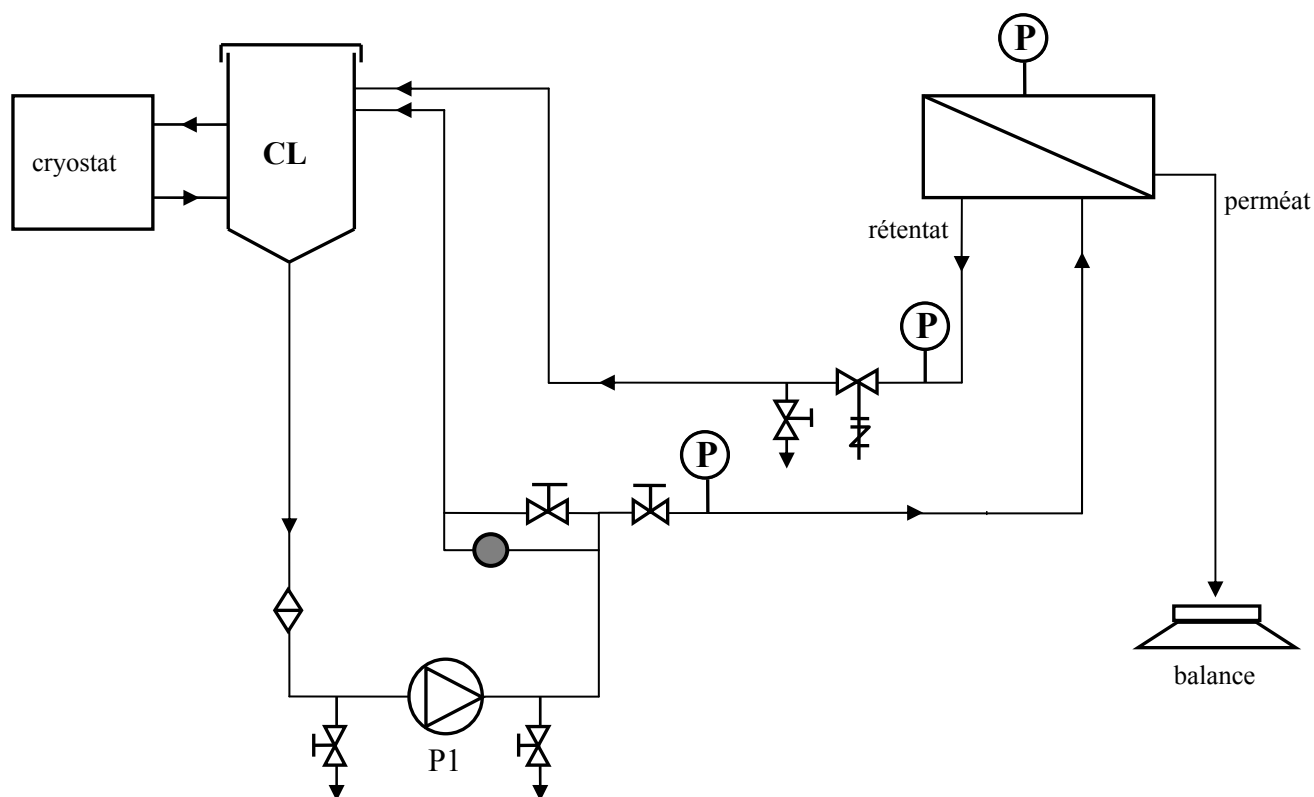
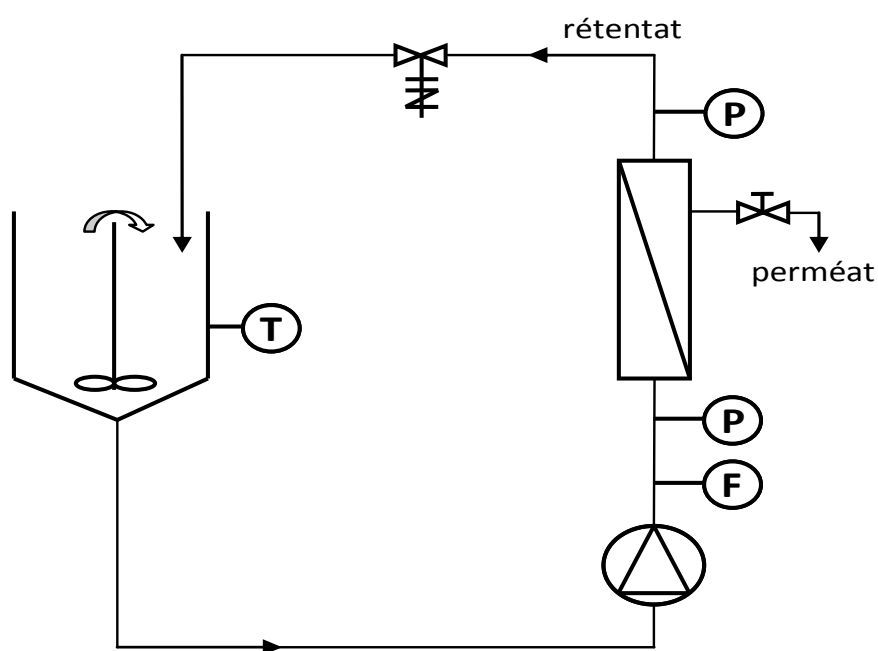


Figure 4. Schéma de l'unité pilote d'ultrafiltration et de nanofiltration



Un essai de validation industrielle a été effectué sur un pilote semi-industriel de nanofiltration (Figure 5).

Le pilote a été équipé d'une membrane Osmonics Desal DK de surface de filtration égale à 2,51 m² et dont le seuil de coupure est compris entre 150 et 300 Da. L'essai est réalisé en mode concentration, avec une pression transmembranaire initiale de 20 bar, jusqu'à un facteur de concentration volumique de 6. A la suite d'une chute importante du débit de perméat durant la concentration, la pression transmembranaire appliquée a été augmentée à 30 bar. Le débit de circulation de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* a été fixé à 600 L.h⁻¹. Des prélèvements sont réalisés dans le rétentat initial et final, ainsi que dans le perméat à différents facteur de réduction volumique. Lors de cet essai, 80 L d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* à 40 g d'extrait sec soluble.kg⁻¹ ont été utilisés.

6-2- Caractéristiques des membranes

Les caractéristiques des huit membranes d'ultrafiltration et des dix membranes de nanofiltration testées sont répertoriées respectivement dans le **tableau 4**. Ces caractéristiques proviennent soit des fabricants de membranes soit ont été mesurées au cours des essais sur le pilote de laboratoire.

6-3- Exploitation des résultats

La comparaison directe des flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire appliquée constitue le premier critère d'évaluation des performances des différentes membranes testées au cours de cette étude. Afin de mesurer la sélectivité des membranes, le taux de rétention pour un composé donné est calculé selon l'équation 22

$$R_i = \left(1 - \frac{C_{ip}}{C_{if}}\right) \cdot 100 \quad (22)$$

où R_i est le taux de rétention du composé i (%), C_{ip} et C_{if} sont respectivement les concentration du composé i dans le perméat et dans l'extrait brut d'*Hibiscus sabdariffa*.

Pour caractériser les membranes de nanofiltration utilisées, nous avons utilisé une approche basée sur la thermodynamique des processus irréversibles. Dans ce cas, les équations décrivant les flux de solvant J_v et de soluté J_s à travers la membrane s'écrivent respectivement à l'aide des équations 23 et 24.

$$J_p = L_p(\Delta P - \sigma \Delta \pi) \quad (23)$$

$$J_s = \omega \cdot (\Delta C) + (1 - \sigma) \cdot \bar{C} \cdot J_p \quad (24)$$

Dans ces équations, les grandeurs affectant le transport de matière (gradient de pression ΔP , pression osmotique $\Delta \pi$, concentration moyenne dans la membrane C et gradient de

Tableau 4. Caractéristiques des membranes d'ultrafiltration (UF) et de nanofiltration (NF)

	Fabricant	Designation	Type de membrane	Seuil de coupure (Da)	Perméabilité à l'eau* (kg·h ⁻¹ ·m ⁻² ·bar ⁻¹)
NF	Dow FILMTEC	NF 90		200-400	3 (0,1)
		NF 200	Polyamide composite couche mince	200-400	4 (0,5)
		NF270		200-400	17 (1)
	Toray	UTC60	Polyamide composite réticulé	- ^a	10 (0,4)
	Koch Membrane	MPF36			9 (0,4)
		MPF34	Composite	- ^a	3 (0,2)
	GE Osmonics	DL	Polyamide polysulfone, couche mince	150 -300	7 (0,1)
		DK		150-300	6 (0,3)
	Microdyn-Nadir	NP010	Polyéthersulphone	- ^a	12 (0,4)
		NP030			4 (0,2)
UF	GE Osmonics	GH		1	6 (0,4) ^b
		GK	Couche mince	2	10 (0,7) ^b
		GE	Polyamide	1	6 (0,1) ^b
	Microdyn-Nadir	UP005		5	26 (1) ^c
		UP020		20	116 (3) ^c
		UH030	Polyéthersulphone	30	119 (3) ^c
		UH050		50	237 (3) ^d
		UP150		150	243 (5) ^d

* A 35 °C, 20 bar et les valeurs proviennent de 3 mesures ± écart-type (n = 3)

^a Information non fournie par le fabricant^b Perméabilité à l'eau mesurée à 20 bar^c Perméabilité à l'eau mesurée 5 bar^d Perméabilité à l'eau mesurée 3 bar

concentration à travers la membrane ΔC , sont reliées entre elles par les trois grandeurs L_p , ω et σ . L_p représente le coefficient de perméabilité au solvant ($\text{m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$), le coefficient de perméabilité au soluté (m.s^{-1}) et σ le coefficient de réflexion, nombre sans dimension variant entre 0 et 1, caractéristique du soluté considéré. $\sigma=0$ Pour le transfert est de type purement convectif tel qu'en ultrafiltration alors que pour $\sigma=1$, il est de type purement diffusif tel qu'en osmose inverse., L_p et σ sont déterminés graphiquement à partir des courbes $J_p = f(\Delta P)$. En les supposant constant ω , ΔC et C sont déterminés sur la gamme de pression étudiée à partir de la courbe $J_s = f(J_p)$.

7- Conduite de l'évaporation osmotique

7-1- Descriptif du pilote

L'unité pilote d'évaporation osmotique (EVAPOSMO E 17 7001) a été mise au point conjointement par EURODIA (Wissous, France) et le CIRAD. Le pilote (**Figure 6**) se compose de deux circuits indépendants correspondant respectivement au produit à concentrer et à la solution extractante (une solution de CaCl_2 dans notre cas).

Figure 6. Schéma du pilote industriel d'évaporation osmotique EURODIA/CIRAD

Le circuit produit à concentrer, entièrement conçu en acier inoxydable comporte une cuve d'alimentation d'une capacité maximale de 50 L, une pompe volumétrique (Hilge, Santeny, France) avec un débit maximal de $10 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$, un débitmètre électro-magnétique (AOMAC SE 204 ME) et un module membranaire contenant des fibres creuses. Ce circuit est équipé de trois vannes et possède une boucle de concentration de 19,5 L. Le circuit saumure en PVC comporte une cuve contenant la saumure, une pompe centrifuge adaptée au transfert de solution corrosive d'une capacité nominale de $10 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ (HMP-N 32/125, Les Lilas, France), un débitmètre (GEORG FISCHER SK 300, Schweiz/Switzerland). La cuve de saumure est

munie d'un support permettant de recueillir des cristaux de CaCl_2 destinés à maintenir la saumure à saturation au cours du procédé. Un groupe froid permet de réguler la température de la saumure à des valeurs comprises entre 37 et 42 °C.

Les deux circuits sont largement instrumentalisés afin de suivre les paramètres du procédé. Ainsi chaque circuit est équipé de capteurs de niveau, de sondes de température et de pression. L'équipement industriel de concentration par évaporation osmotique est équipé d'un module membranaire en fibres creuses de polypropylène. Ce module initialement conçu pour la filtration stérilisante de gaz à une surface totale de 10 m² et un diamètre moyen des pores de 0,2 µm. Les principales caractéristiques du module sont reportées dans le **tableau 5**. Le produit à concentrer circule à l'intérieur des fibres alors que la saumure circule à l'extérieur.

Tableau 5. Principales caractéristiques du module membranaire d'évaporation osmotique

Caractéristiques	Symbole	Valeur
Nombre de fibres creuses dans le module	n	1800
Longueur des fibres (m)	L	1
Diamètre interne des fibres creuses (m)	d	1,8 10 ⁻³
Porosité (% de vide)	ε	75
Epaisseur des fibres (µm)	e	800
Energie de surface (N m ⁻¹)	E _s	30 10 ⁻³
Diamètre moyen des pores (µm)	Dp	0,2
Superficie totale (m ²)	S	10,18

7-2- Mise en régime et conduite du procédé

La mise en régime constitue l'étape la plus critique dans l'utilisation de ce pilote industriel d'évaporation osmotique. D'abord le circuit concentré est rempli avec au moins 50 L du produit à concentrer (eau, solution de saccharose, jus de fruits, extrait d'*Hibiscus sabdariffa*). Ensuite le circuit saumure est rempli avec 60 litres de solution de CaCl_2 à une concentration comprise entre 5,5 et 6,0 mol.L⁻¹. Au niveau du tableau de commande, on règle le débit de la pompe de circulation du produit à concentrer (P_J) à 2 m³.h⁻¹. Le pilote est alors mis en marche. Pour compenser la baisse de niveau de la saumure, 10 litres de solution de CaCl_2 sont rajoutés dans la cuve. Les débits jus et saumure sont progressivement portés aux valeurs de consignes tout en vérifiant que la différence de pression entre les deux circuits n'excède pas 0,1 bar avec une surpression côté jus. Des cristaux de CaCl_2 sont rajoutés périodiquement pour maintenir la concentration de la saumure entre 5,5 et 6,0 mol.l⁻¹.

Dès que la saumure commence à circuler, le processus d'évaporation osmotique démarre. Il se déroule en trois phases. Une première étape d'évaporation à l'interface solution à

concentrer/membrane, suivi par un transport en phase vapeur à travers les pores puis par une étape de condensation à l'interface membrane/saumure. L'eau évaporée se retrouve donc dans la saumure dont le réservoir est percé dans sa partie supérieure. Ainsi le surplus de saumure est recueilli dans un récipient placé sur une balance (Precia Molen, Privas, France) avec une capacité maximum de $30 \pm 0,01$ kg. La différence de masse entre deux mesures successives donne le flux d'évaporation. Au cours de l'évaporation, la masse de saumure, les températures, pressions et vitesses de circulation dans les deux circuits sont notées toutes les 5 min pendant toute la durée de l'essai. Le circuit jus est alimenté régulièrement avec le produit à concentrer. Ce mode d'alimentation réduit le temps de contact du jus avec l'air et donc limite les risques d'oxydation du concentré. Le trop plein de saumure est récupéré, évaporé par chauffage puis cristallisé par un refroidissement rapide et amorçage de la cristallisation par ajout de cristaux de CaCl_2 . Les blocs de sel formés sont broyés. Ils seront utilisés au cours des prochains essais d'évaporation osmotique. A la fin du processus de concentration, l'unité pilote est lavée en rinçant abondamment le circuit concentré avec de l'eau chaude à 40°C jusqu'à ce que l'eau de rinçage atteigne une teneur en extrait sec soluble égale à zéro. Ensuite, le circuit est rempli avec une solution alcaline (NaOH , 0,375 N) à 50°C qui est mise en circulation pendant 40 minutes. Le circuit est alors finalement rincé avec de l'eau déminéralisée. Le circuit est ensuite soumis à une solution d'acide nitrique à 1 % pendant 20 min. Il est de nouveau rincé avec de l'eau déminéralisée jusqu'à un pH de 7. Le circuit saumure est vidangé et rincé deux fois avec de l'eau chaude.

7-3- Mesure et régulation des paramètres du procédé

7-3-1- Température

Les améliorations apportées au pilote ont fait que, seule la température de la saumure est contrôlable grâce à l'incorporation d'un groupe froid. La température du concentré est gouvernée par celle de la saumure à travers la membrane qui est suffisamment conductrice de chaleur. La température de la saumure est modulée en mettant en route ou non le groupe froid. Dans ces conditions de travail et du fait de la réaction exothermique lors de la dissolution des cristaux de CaCl_2 , la température de la saumure est toujours supérieure à celle du produit à concentrer. Néanmoins, une régulation manuelle, nous a permis de maintenir cette différence aussi faible que possible entre de 2 à 4°C .

7-3-2- Vitesses tangentielles

Les flux de circulation au sein des boucles « saumure » et « concentré » sont modulés respectivement à l'aide de vanne et du variateur de fréquence commandant la pompe de circulation du jus. Les vitesses tangentielles de circulation sont comprises entre 0,29 et 0,31 m.s^{-1} et 0,26 et 0,45 m.s^{-1} respectivement dans le circuit jus et le circuit saumure.

7-3-3- Pressions

Du côté saumure, la pression à l'intérieur du circuit est pratiquement fixe pour un débit donné. Du côté du concentré, l'évolution de la pression au sein du circuit est plus ample. Elle évolue en fonction de la teneur en extrait sec soluble du produit à concentrer. En effet, au cours du processus d'évaporation osmotique, lorsque la teneur en extrait sec soluble (ESS) devient supérieure à $400 \text{ g ESS.kg}^{-1}$, l'augmentation exponentielle de la viscosité se traduit par un accroissement de la pression dans le compartiment jus. Ainsi, pour maintenir une différence de pression de 0,5 bar au maximum entre les deux compartiments, on augmente soit le débit de circulation de la saumure, soit on diminue celui du concentré.

7-3-4- Concentration

La concentration du jus au sein de la boucle "concentré" est mesurée à l'aide d'un réfractomètre (PAL-3 ATAGO, Japon) en prélevant des échantillons via une vanne de prélèvement de concentré. Concernant la saumure, la concentration en chlorure de calcium est suivie par mesure de sa densité qui est reliée à sa concentration par une droite d'étalonnage. Le pilote ne permet pas une régulation fine de la concentration de la saumure qui fluctue en fonction du débit évaporatoire de 5,0 à 6,0 mol.L⁻¹.

7-3-5- Activité en eau

L'activité en eau a été mesurée à la température de 35 °C à l'aide d'un appareil de marque AquaLab 4TE (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) préalablement calibré avec des sels spécifiques d'activité en eau connue.

7-3-6- Détermination du nombre de Reynolds

Pour caractériser le type d'écoulement dans les deux compartiments de la membrane, le nombre de Reynolds a été évalué au cours du processus d'évaporation osmotique. Pour cela la viscosité et la densité ont été déterminés. Les viscosités des jus, des extraits et de leurs concentrés ont été déterminées à 35 °C en utilisant un viscosimètre rotatif Haake VT 550 (Berlin, Germany). La densité a été déterminée par pesée d'un volume connu (fiolle jaugée de 25 mL) sur une balance de précision SARTORIUS ($100 \pm 0,0001 \text{ g}$).

Résultats et Discussion

Les résultats issus de ces travaux de recherche sont présentés et discutés à travers six chapitres :

- Caractérisation et stabilité des extraits anthocyaniques
- Optimisation de l'extraction aqueuse des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*
- Microfiltration de l'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa*
- Pré-concentration par ultrafiltration et nanofiltration
- Concentration par évaporation osmotique
- Couplage des opérations unitaires

A l'exception des résultats de la caractérisation de deux variétés d'*Hibiscus sabdariffa* et de ceux du dernier chapitre, couplage d'opérations unitaires, l'ensemble des résultats sont présentés sous forme de publications scientifiques. Dans ce cas, la présentation de l'article et des principaux résultats obtenus précèdent la publication sous sa forme originale. Par soucis de simplicité toutes les références bibliographiques citées sont regroupées dans la liste présentée à la fin du mémoire.

1- Caractérisation et stabilité des extraits anthocyaniques

1-1-Caractérisation des calices d'*Hibiscus sabdariffa*

Les principales caractéristiques de deux variétés d'*Hibiscus sabdariffa* utilisées au cours de ce travail (**Photo 1**) sont données dans le **tableau 1**. Les valeurs trouvées sont en concordance avec les données de la littérature (cf. chapitre 1-2 de la synthèse bibliographique).

THAI



VIMTO



Photo 1. Calices séchés des 2 variétés utilisées d'*Hibiscus sabdariffa*.

Les deux variétés présentent des caractéristiques significativement différentes. Par exemple, la variété Vimto présente des teneurs de 14,8 et 37,4 g.kg⁻¹ respectivement en anthocyanes et polyphénols. Ces teneurs sont au moins deux fois plus importantes que celles de la variété Thai. Elles concordent parfaitement avec la réalité pratique. En effet, lors de la préparation de boisson, les extraits aqueux préparés à partir des calices de la variété Vimto ont une coloration rouge plus attrayante et plus foncée. Cette forte coloration rouge est à la base du succès commercial de la variété Vimto dont les calices sont 50 % plus chers que ceux de la variété Thai.

La comparaison de la teneur en anthocyanes avec d'autres végétaux montre que les calices d'*Hibiscus sabdariffa* sont une excellente source d'anthocyanes. La production d'extraits anthocyaniques valorisables en colorant naturel à partir des calices représente donc un fort potentiel de développement pour cette production végétale.

Tableau 1. Composition des calices de deux variétés d'*Hibiscus sabdariffa*. Les valeurs entre parenthèses représentent les écart-types provenant de trois répétitions.

	Unités	THAI	VIMTO
Matière sèche	g.kg ⁻¹ MF	901 (2,14)	929 (2,14)
Acidité titrable (exprimé en acide malique)		190 (1,10)	130 (1,19)
Protéines	g.kg ⁻¹ MS	61 (0,04)	104 (3,45)
Lipides totaux		10 (0,87)	5 (0,07)
Sucres totaux		53 (1,04)	59 (1,34)
Acide malique		10,1 (0,04)	24,6 (0,07)
Acide oxalique		6,7 (0,04)	8,2 (0,05)
Acide tartrique		3,2 (0,04)	3,6 (0,05)
Acide citrique		0,3 (0,01)	0,3 (0,02)
Vitamine C		0,70 (0,02)	5,0 (0,02)
Potassium		5,1 (0,001)	18,6 (0,002)
Calcium	mg.kg ⁻¹ MS	9,1 (0,002)	7,8 (0,002)
Magnésium		3,8 (0,001)	3,9 (0,001)
Fer		0,38 (< 0,001)	0,22 (< 0,001)
Anthocyanes totaux	g.kg ⁻¹ MS	7,67 (0,47)	14,80 (0,58)
Polyphénols totaux		13,47 (1,25)	37,36 (0,81)
ORAC	μmol Trolox.g ⁻¹	226 (8)	294 (7)

L'acidité titrable exprimée en acide malique est très importante dans les deux variétés. Les teneurs sont de 190 et 130 g.kg⁻¹ de matière sèche respectivement pour la variété Thai et Vimto. Cette forte acidité est à l'origine du faible pH rencontré dans les extraits d'*Hibiscus sabdariffa* (2,1-2,4).

Les acides tartrique, oxalique et citrique sont également présents dans les calices. Les teneurs en vitamine C sont relativement importantes. Elles sont comparables à celles de l'orange mais largement inférieures à celles du pain de singe (150-300 mg/100g) (54) ou du ditax (967 mg/100g) (168) deux autres fruits largement consommés au Sénégal.

Les teneurs élevées en anthocyanes, polyphénols et vitamine C sont très probablement à l'origine du pouvoir antioxydant élevé des calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Evalué par la méthode ORAC, les pouvoirs anti-oxydant sont de 226 et 294 μmol Trolox.g⁻¹ respectivement pour la variété Thai et Vimto. Ces valeurs sont largement supérieures à ceux du fruit du baobab (88 μmol Trolox.g⁻¹), de la mûre (72 μmol Trolox.g⁻¹), du raisin (87 μmol Trolox.g⁻¹), du brocoli (126 μmol Trolox.g⁻¹), de la betterave rouge (115 μmol Trolox.g⁻¹) ou de la tomate

(67 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$) (54, 169-171). Ceci confère aux calices d'*Hibiscus sabdariffa* un intérêt nutritionnel supplémentaire.

L'analyse des éléments minéraux indique que les teneurs en potassium et calcium assez intéressantes. Comme dans la plupart des produits végétaux, le composé minéral qui prédomine est le potassium (18,6 g.kg^{-1}).

1-2- Etude de la dégradation thermique des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*

En prélude à l'optimisation des conditions d'extraction aqueuse des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*, nous avons jugé nécessaire de nous intéresser d'abord à l'impact de la température sur les anthocyanes, composés réputés thermosensibles.

Cette partie est présentée en détails dans la publication n° 3 qui suit. Le but de cette étude est de mesurer les paramètres cinétiques de dégradation des anthocyanes afin de disposer d'un outil permettant de prévoir les pertes occasionnées par un traitement thermique (pasteurisation ou extraction à chaud). Plusieurs modèles cinétiques ont été utilisés à ce niveau : les modèles classiques basés sur des approches empiriques (Arrhenius et Ball) et modèle moins courant issu de la thermodynamique chimique (modèle d'Eyring). La capacité de ces trois modèles à décrire les cinétiques de dégradation thermique des anthocyanes a été évaluée et validée dans des extraits aqueux d'*Hibiscus sabdariffa* et dans différents jus de fruits de référence (jus de mûre et d'orange sanguine). Les effets de la teneur en oxygène dissous et des solides en suspension sur la dégradation des anthocyanes ont été mis en évidence.

Pour ce faire, des cinétiques de dégradation thermique ont été conduites entre 30 et 90 °C sur des extraits d'*H. sabdariffa* préparés à partir de calices de quatre variétés et sur les jus de de mûre et d'orange sanguine. Au cours de ces essais, la teneur en oxygène dissous dans les produit a variée entre 0,45 et 8,50 mg.L^{-1} , tandis que celle des solides en suspension dans le jus mûre était comprise entre 12 et 63 g.kg^{-1} .

L'analyse des données expérimentales montre que la dégradation des anthocyanes suit une réaction d'ordre 1. En effet, le logarithme des concentrations en anthocyane est proportionnel au temps de traitement avec des coefficients de régression compris entre 0,93 et 0,99. Les constantes de vitesse k sont significativement différentes en fonction des produits. Les extraits d' *H. sabdariffa* ont montré les plus faibles valeurs de k comprises entre 100 et 600.10⁻⁷ s⁻¹ et des différences significatives ont été notées entre les différentes variétés. Une teneur élevée en solides insolubles en suspension fournie une légère protection contre la dégradation des anthocyanes. L'effet de la température semble être prédominant sur la détérioration des anthocyanes par rapport à l'effet de l'oxygène dissous

Avec des coefficients de régression compris entre 0,916 et 0,996, les trois modèles décrivent de façon satisfaisante la dépendance de k et D sur la température. Les différents paramètres

cinétiques tels que l'énergie d'activation (E_a), l'entropie d'activation (ΔS^*) et le facteur z ont pu être déterminés pour l'ensemble des anthocyanes. Ainsi, le jus d'orange sanguine et l'extrait aqueux d' *H. sabdariffa* de la variété Thai avec des valeurs respectives de 66 et 61 kJ.mol⁻¹ ont montré les énergies d'activation les plus élevées. Leurs anthocyanes seraient donc plus sensibles à une augmentation de la température que ceux contenus dans les autres produits. Pour valider ces modèles prédictifs, les pertes expérimentales sont comparées aux valeurs calculées à l'aide des trois modèles. Les valeurs similaires obtenues ont permis de valider les modèles aussi bien dans des conditions isothermes que non isothermes. Les courbes indiquent que lors de traitement de pasteurisation classique ou d'extraction aqueuse à des températures comprises entre 70 et 90 °C pendant 5 à 30 min, les pertes en anthocyane sont inférieures à 5 %.

Cependant, malgré ces pertes très faibles en anthocyanes, les composés de dégradation formés pourraient fortement contribuer à la diminution de la stabilité des anthocyanes durant le stockage. Ceci est l'objet de l'étude présentée dans la publication n° 3..

Publication n° 3

**Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood,
orange, blackberry, and roselle using the Arrhenius,
Eyring, and Ball models**

.J. Agric. Food Chem., (2009), 57, 6285–6291

Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models

MADY CISSE,[†] FABRICE VAILLANT,[‡] OSCAR ACOSTA,[§] CLAUDIE DHUIQUE-MAYER,[‡]
 AND MANUEL DORNIER^{*,‡}

[†]Ecole Supérieure Polytechnique (ESP), Université Cheikh Anta Diop, B.P. 5085, Dakar Fann, Senegal,

[‡]UMR 95 QUALISUD, CIRAD, Montpellier SupAgro, 73 rue J. F. Breton, TA B-95/16, F-34398

Montpellier cedex 5, France, and [§]Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA),
 Universidad de Costa Rica (UCR), Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Código Postal 11501-2060,
 San José, Costa Rica

Anthocyanin stability was assessed over temperatures ranging from 30 to 90 °C for seven products: blood orange juice [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]; two tropical highland blackberry juices (*Rubus adenotrichus* Schlecht.), one with high content and the other with low content of suspended insoluble solids (SIS); and four roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa* L.). The blackberry juice showed the highest content of anthocyanins with 1.2 g/L (two times less in the roselle extracts and 12 times less in the blood orange juice). The rate constant for anthocyanin degradation and isothermal kinetic parameters were calculated according to three models: Arrhenius, Eyring, and Ball. Anthocyanins in blood orange juice presented the highest rate constant for degradation, followed by the blackberry juices and roselle extracts. Values of activation energies were 66 and 37 kJ/mol, respectively, for blood orange and blackberry and 47–61 kJ/mol for roselle extracts. For the blackberry juices, a high SIS content provided only slight protection for the anthocyanins. The increasing content of dissolved oxygen, from 0.5 to 8.5 g/L, did not significantly increase the rate constant. For both isothermal and nonisothermal treatments, all three models accurately predicted anthocyanin losses from different food matrices.

KEYWORDS: *Citrus sinensis*; *Rubus adenotrichus*; *Hibiscus sabdariffa*; thermal degradation kinetics; anthocyanins

INTRODUCTION

Recent toxicological alerts have led to bans on several artificial colorants for foodstuffs. The food industry is now using plant sources to develop various additives that have both coloring and antioxidant properties (1). Consequently, the market for natural food colorants is growing by 4–6% per year, as compared with that of artificial colorants, which is growing by only 2–3% per year (1).

The main groups of natural food colorants are anthocyanins, betacyanins, carotenoids, curcuminoids, and chlorophylls. The restrictions in the use of certain synthetic colorants greatly reduced the color palette available to the food industry. No color was spared, but that of red is, without doubt, the most affected. The banning of FD&C Red No. 2 (also called Amaranth) in the United States by the U.S. Food and Drug Administration, Orange RN in Britain, and Ecarlate GN and Ponceau GR (both reds) in France has led to an increased use of natural sources for red pigments (1). The largest group of water-soluble, natural, red pigments that offers alternatives to synthetic colorants is comprised of the anthocyanins.

Anthocyanins are flavonoids that are characterized by a flavylium nucleus that exhibits maximum absorbance in the green/blue spectrum at 510 nm. These pigments are widespread throughout the plant kingdom and are responsible for the attractive colors—salmon, pink, scarlet, magenta, violet, purple, and blue—of most fruits, vegetables, flowers, leaves, and roots and other storage organs.

Many edible plants are sources of anthocyanins and flavonoids (2–4). These include roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa*), blackberry (*Rubus* spp.), and blood orange (*Citrus sinensis*), which are particularly targeted by the beverage industry. Roselle calyx contains high amounts of anthocyanins that can be as much as 2.5 g/100 g DW (5–7). The calyx contains mainly two anthocyanins: delphinidin 3-xylosylglucoside and cyanidin 3-xylosylglucoside. Blackberries (*Rubus* spp.) also present high concentrations of anthocyanins that may be as much as 3.9 g/100 g DW, depending on variety and cultivar (2, 8). Various anthocyanins have been identified in blackberries (9), but in the wild tropical highland variety (*Rubus adenotrichus*), found in tropical Latin America studied in this paper, only two anthocyanins predominate, cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-(6'-malonyl) glucoside (2). The anthocyanin content in blood orange

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33/467614432. Fax: +33/467614433. E-mail: dornier@cirad.fr.

ranges between 1 and 1.5 g/100 g DW. About 10 anthocyanins have been identified in blood orange (10), but cyanidin 3-glucoside and an acylated anthocyanin, that is, cyanidin 3-(4'-acetyl)-glucoside, predominate.

Edible sources of anthocyanins are highly appreciated by the food industry for their coloring properties, which can give foods various hues of red and violet. In addition to their potential health effects (11), beneficial effects for controlling human diseases have also been reported in the literature (12), including the reduction of risks of coronary heart disease, cancer, and stroke (13).

The main problem of anthocyanins as food colorants is their instability in the presence of endogenous enzymes [e.g., peroxidase, polyphenoloxidase, and β -glucosidase (1, 14)] and heat. Indeed, thermal degradation of anthocyanins is a major problem for the food industry. Degradation kinetics during heating depends mainly on both the specific composition of anthocyanins and the characteristics of the food matrix. For instance, the presence of ascorbic acid (15, 16), phenolic compounds (17), micellar systems (18), and soluble solids (19) may alter degradation kinetics. Hence, thermal stability of anthocyanins has been studied in different food matrices such as sour cherry (4), red and black raspberry (20), grape (21), strawberry (22), acerola (16), roselle (23, 24), blackberries (25), and even juice blends (26). Reported results show that rate constants for anthocyanin degradation with respect to temperature can always be assumed to follow a first-order reaction.

Even so, the Arrhenius model (eq 1)—an empirical collision model based on the classic approach used for chemical reactions—is often considered as a reference; other models can also be used to describe the temperature dependence of the degradation reaction rate of anthocyanins (25, 27, 28). In this study, two other models were investigated. The theoretical Eyring model, also known as the Eyring–Polanyi model, is based on the transition state theory in which the enthalpy of activation (ΔH^*) and entropy of activation (ΔS^*) are the model's parameters (eq 2). The Ball model follows the approach commonly used in food processing for microorganisms destruction. It defines a decimal reduction time (D), which is related to temperature via a z factor (eq 3). The aim of this study was to compare the classical empirical approaches (Arrhenius and Ball models) and an approach based on statistical thermodynamics (Eyring). Then, the ability of these three models to describe the thermal degradation kinetics of anthocyanins was evaluated across different fruit juices and plant extracts, with different contents of dissolved oxygen and insoluble solids.

$$k = k_{\infty} e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1)$$

with T expressed in K, k_{∞} = pre-exponential factor = value of k at $T \rightarrow \infty$ (1/s), E_a = activation energy (J/mol), and R = gas constant = 8.31 J/mol K.

$$k = \frac{k_B}{h} T \times e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}} = \frac{k_B}{h} T \times e^{-\frac{\Delta H^* - T\Delta S^*}{RT}} \quad (2)$$

with T expressed in K, ΔG^* = free activation enthalpy (J/mol), ΔH^* = activation enthalpy (J/mol), ΔS^* = activation entropy (J/mol K), k_B = Boltzmann constant = 1.381×10^{-23} J/K, h = Planck constant = 6.626×10^{-34} J s, and R = gas constant = 8.31 J/mol K.

$$D = D_0 10^{-\frac{T}{z}} \quad (3)$$

with T expressed in °C, D_0 = value of D at $T = 0$ °C (s), and z factor (°C).

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Juice Preparation. Fully ripe blackberry fruits (*R. adenotrichus* Schlech.) were harvested in Cartago (Costa Rica) at 1500 m above sea level. A proportion of the collected fruits was pressed, using a discontinuous OTC 25 ton hydraulic press (OTC, Owatonna, MN) to obtain the blackberry reference juice (BRJ). The remaining fruits were sieved with an industrial extractor (sieves 15 and 8 mm) to obtain blackberry pulpy juice (BPJ).

Blood oranges (cv. Sanguinelli, *C. sinensis* L. Osbeck) were purchased from the collection of INRA-CIRAD at the Agronomic Research Station of INRA (Corsica, France). Fruits were hand-squeezed and then filtered through a stainless steel sieve (1 mm). Both blackberry and blood orange juices were placed in amber-sealed vials (125 mL) under nitrogen and kept frozen at -20 °C until analyzed.

Four varieties of roselle (*H. sabdariffa* L.) were used. One came from Guatemala, and the others came from Senegal. The Senegalese varieties were Koor, Vimto, and Thai (29) and were harvested in Thiarié Village, Kaolack Region (central Senegal). Varieties Koor and Vimto were of Sudanese origin, whereas Thai, as its name indicates, originated in Thailand. To prepare the roselle extract, the dried calyces were mixed with plain water at a mass ratio of calyx to water of 1:10 at a temperature of 25 °C for 10 h. The extract was then filtered through a stainless steel sieve (1 mm) and placed in amber-sealed vials (125 mL) under nitrogen and kept frozen at -20 °C until analyzed. Commercially, these products are available mainly as a single strength juice for the blood orange and as beverages formulated with water and sucrose for the blackberry and roselle.

Physicochemical Analysis. All juices or extracts were analyzed for pH, titratable acidity, and density using standard methods (30). The total soluble solids (TSS) content was measured with an Abbe refractometer (Atago, Japan), whereas the content of suspended insoluble solids (SIS) was measured as described in ref (31). Polyphenols were evaluated as described in ref (32). Vitamin C (ascorbic acid and dehydroascorbic acid) was assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (33, 34) using an Agilent 1100 system (Massy, France), as were sucrose, fructose, and glucose (35). The amount of dissolved oxygen was measured with a portable oxygen probe CyberScan DO 300 (Eutech Instruments, Singapore). The total anthocyanin content was assessed by the pH differential method (36). All absorbance readings were made against distilled water, which acted as the control. Spectrophotometric measurements were carried out using Shimadzu spectrophotometers (UV-1200 and UV-1605, Kyoto, Japan). Concentrations were expressed as cyanidin 3-glucoside (MW = 449 g/mol) equivalents for blood orange and blackberry and delphinidin 3-xylosylglucoside equivalents for roselle (MW = 577 g/mol). The molar extinction coefficient at pH 1 and 510 nm, used for calculation, was 26900 L/mol cm for cyanidin 3-glucoside (25). For delphinidin 3-xylosylglucoside, we used 26000 L/mol cm as determined experimentally using delphinidin chloride as the reference (Extrasynthese, Genay, France). All of the other reagents used were of analytical grade and were purchased from Sigma (L'Isle d'Abeau, France).

Thermal Treatment. Juices or aqueous extracts (15 mL) were heated in sealed Pyrex tubes (100 mm long, 16 mm i.d.). The tubes were immersed in a thermostatic bath (AM 3001 K, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) that was filled with oil or water. A Heidolph EKT 3001 digital temperature controller (± 1 °C), fitted to a filed sealed tube, was used as a control to measure the product temperature during experiments. The time for the solution to reach the temperature setup was between 20 s and 4 min, respectively, for 30 and 100 °C. After the treatment, the tubes were immediately cooled by submersion in an ice bath. The time to reach 25 °C was, at most, 1 min for all trials. Therefore, as compared with the time lag at temperature setup, transient states were deemed to be negligible, and the treatment was assumed to be isothermal. Residual anthocyanin contents were immediately assessed after thermal treatment. All trials and measurements were made in triplicate. For trials with various dissolved oxygen contents, the value was adjusted by bubbling in nitrogen or filtering air through at 0.45 μ m. From these experimental data, the parameters of the three kinetic models were identified using linear regressions.

For the nonisothermal treatment, the pasteurization values $F_{70^\circ\text{C}}$ were calculated, using 70 °C as the reference temperature and a z factor for microorganisms of 10 °C, according to eq 4.

$$F_{70^\circ\text{C}} = \int_0^t 10^{\frac{T-70}{z}} dt \quad (4)$$

Table 1. Main Characteristics of Juices and Roselle Extracts^a

	blood orange	blackberry		extract of roselle calyx ^b			
		reference	pulpy	Guatemala	Koor	Vimto	Thai
pH	3.53 (0.05)	2.67 (0.05)	2.68 (0.05)	2.46 a (0.05)	2.23 b (0.05)	2.55 c (0.05)	2.35 b (0.05)
TSS (g/kg)	115 (4)	123 (5)	125 (4)	31 a (2)	32 a (2)	41 b (2)	33 a (2)
SIS (g/kg)	12 (0.5)	12 (0.5)	63 (15)	0	0	0	0
titration acidity (g citric acid/kgTSS)	87 (5)	202 (8)	194 (6)	180 a (6)	199 b (6)	185 a (5)	190 b (4)
glucose (g/kg TSS)	ND	228 (10)	216 (11)	31 a (2)	31 a (2)	32 a (2)	33 a (2)
fructose (g/kg TSS)	ND	228 (10)	224 (12)	40 a (3)	39 ab (2)	35 ab (3)	33 b (3)
sucrose (g/kg TSS)	305 (6)	8 (1)	8 (1)	31 a (2)	32 a (2)	35 a (3)	38 b (3)
ascorbic acid (mg/100 g)	51 (2)	44 (2)	45 (3)	30 a (1)	30 a (1)	34 b (1)	27 c (1)
anthocyanin (mg/L)							
cyanidin 3-glucoside	98(6)	1189 (55)	1233 (49)	315 (23)	250 (18)	718 (54)	306 (25)
delphinidin 3-xylosylglucoside				245 (18)	194 (12)	559 (35)	238 (15)

^a Numbers in parentheses indicate the standard deviation of three analyses. ND, not determined. ^b Values with similar letters are not significantly different (Tukey, $P > 0.05$).

Experimental Design and Statistics. For the BRJ and the Guatemalan roselle extract, thermal degradation of anthocyanins was studied, following a central composite rotatable design (CCRD) with two variables, temperature (X_1) and dissolved oxygen content (X_2), and five levels for each variable. The temperature and dissolved oxygen content ranged between 35 and 98 °C and 0.4 and 8.5 mg/L, respectively. The rate constant k evaluated experimentally was used as a response and computed, using multiple linear regression (JMP v.5.1; SAS, NC) to fit a second-order polynomial equation (eq 5).

$$k = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{12}X_1X_2 + \varepsilon \quad (5)$$

where a_n values are constant regression coefficients and ε the error of the model.

Statistical tests for evaluating the relevance of the models were the correlation coefficient between the actual and the predicted response (R^2), the probability that tests for the absence of at least one significant regression factor in the model (P), and the probability that tests if the lack of fit of the model is zero (P_{lot}).

RESULTS AND DISCUSSION

Physical and Chemical Characteristics of the Food Matrices.

The main physicochemical properties of the blood orange and blackberry juices and roselle calyx extracts are shown in Table 1. The blackberry juices presented the highest levels of anthocyanins, followed by roselle extracts and blood orange juice. Contents of the anthocyanin cyanidin 3-glucoside in the blackberry juices are at least two times the content found in the roselle extracts and 12 times that of blood orange juice.

The roselle extracts presented significant differences in anthocyanin contents and titratable acidity according to cultivar. The cultivar richest in anthocyanins is less acid, and in Senegal, to produce a beverage from roselle, the calyxes of the more acid cultivars (Koor and Thai) are generally mixed with those of cultivar Vimto to produce an extract with a strong red hue and a more balanced acidity (29). Acidity and anthocyanin content appear to be influenced by cultivar and climatic and geographical conditions (37, 38).

Kinetics of Anthocyanin Degradation during Heat Treatment.

Examples of the degradation kinetics of total anthocyanins from roselle cv. Thai extract, BRJ juice, and blood orange are shown in Figure 1. The decrease of anthocyanins over time fit a first-order equation with a good regression coefficient ($0.93 < R^2 < 0.99$).

The kinetic parameters k and D , respectively, corresponding to Arrhenius and Eyring (eqs 1 and 2) and Ball models (eq 3), were calculated. So, the k and D values ranged between 145 and 1660×10^{-7} 1/s and 13 – 158×10^3 s for the blood orange juice, 81 – 747×10^{-7} 1/s and 30 – 284×10^3 s for BRJ, 67 – 671×10^{-7} 1/s and 34 – 341×10^3 s for BPJ, and 10 – 751×10^{-7} 1/s and 30 – 2280×10^3 s for roselle extracts. The reaction rate constant k and D differed

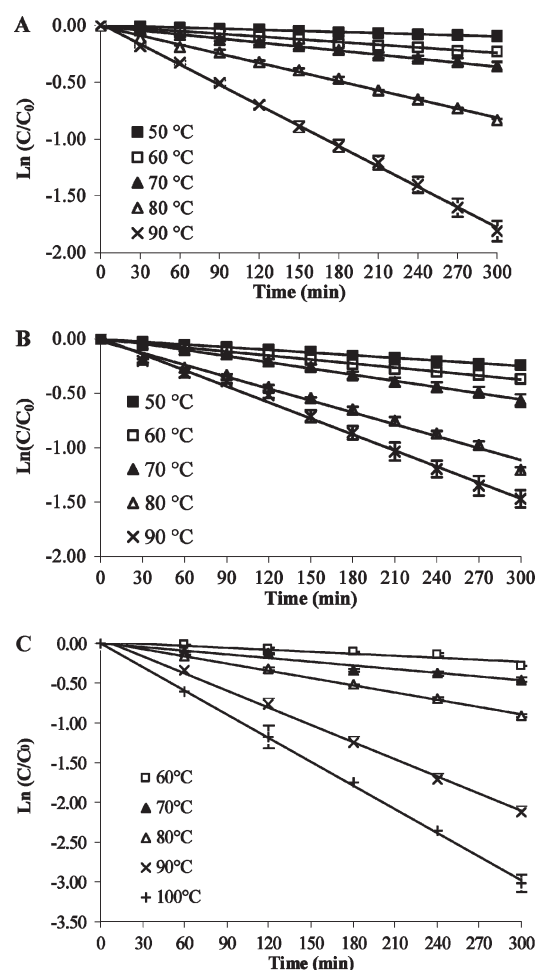


Figure 1. Examples of thermal degradation kinetics of anthocyanins vs temperature in (A) roselle cv. Thai extract, (B) BRJ, and (C) blood orange juice. Standard deviations were evaluated in triplicate.

significantly among the products tested. Anthocyanins from blackberry juice with low SIS content (BRJ) presented the highest reaction rate for lower temperatures, ranging from 81×10^{-7} 1/s at 30 °C to 582×10^{-7} 1/s at 80 °C for the k parameter. At 90 °C, anthocyanin from blood orange presented the highest reaction rate being 145×10^{-7} 1/s at 90 °C in agreement with previous results (27). Differences among reaction rates k appeared to increase at higher temperatures for blood orange juice being only 1.4 times more than the roselle cv. Vimto extract at 60 °C but almost two times more at 90 °C. On the contrary, reaction rate

constants for anthocyanins from the blackberry juices differed significantly from roselle extracts at lower temperatures (between 30 and 40  C), but at higher temperatures (70 and 90  C), differences became nonsignificant statistically ($P < 0.05$). Roselle extracts presented the lowest reaction rates at low temperatures. However, the roselle cv. Thai extract behaved significantly differently, as compared with the other cultivars, at lower temperatures. For temperatures between 60 and 90  C, the reaction rate of all roselle cultivars grown in similar conditions in Senegal (Koor, Vimto, and Thai) ranged between 100 and 600×10^{-7} 1/s for k , thus agreeing with previous data obtained by other authors (24). The Guatemalan cultivar nevertheless presented a lower reaction rate at 90  C than did the other cultivars grown in Africa.

The variation between all of these products may be explained by the chemical composition of both products, the content of dissolved oxygen, and the anthocyanin structure. Blood orange juice presented the lowest acidity (i.e., the highest pH) and the highest sucrose and ascorbic acid contents. Previously, low acidity and a pH higher than 3 were shown to considerably reduce anthocyanin stability (39). In addition, although the effect of sucrose on anthocyanins is still not clear, reducing sugars, particularly fructose (40, 41), have been shown to indirectly enhance anthocyanin degradation during heating because of the formation of furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural, which accelerate the rate of anthocyanin degradation (42). The higher content of fructose in the blackberry juices with respect to the roselle extracts may also affect anthocyanin stability. For sucrose, other authors (43) have shown that higher content in anthocyanin solutions delays browning, suggesting that sucrose would contribute to anthocyanin stability under heat. With the major pigment in strawberries, pelargonidin 3-glucoside, fructose, arabinose, lactose, and sorbose provided greater pigment degradation than glucose, sucrose, or maltose (14). The stability of anthocyanins can also be affected by other components. The presence of higher ascorbic acid content in some food matrices is also believed to affect anthocyanins stability during heating (3, 14, 25), although how this happens is not yet well understood (44, 45). Anthocyanins are very reactive toward metals. They will form complexes with tin, copper, and iron (14). Cyanidin 3-glucoside will form a stable colored complex in the presence of aluminum ions at pH 5.5. Anthocyanins can form weak complexes with flavonols, amino acids, benzoic acids, coumarin, and cinnamic acids.

The anthocyanin degradation rates for the blackberry juices with different SIS contents (Table 1) clearly ($P < 0.05$) show that the SIS have a slight protective effect. The two blackberry juices presented similar characteristics, except for the SIS content, which is almost five times higher in the pulpy juice. For the blackberry juice with the high SIS content, rate constant k is considerably smaller for all temperatures tested.

The difference in structure between the main anthocyanins in the products is also a factor to consider. Indeed, the cyanidin-based anthocyanins have quite different stability than delphinidin derivatives. Hydroxyl groups and methoxyl groups on the B ring have an effect on color intensity and stability of anthocyanins (46). For roselle extracts, further study is needed using HPLC to differentiate the two anthocyanins that are present into the products.

Effect of Dissolved Oxygen on Kinetic Constants. In addition to intrinsic factors, anthocyanin stability may also be influenced by external factors such as light, copigmentation, metal complexing, and dissolved oxygen. This last factor, often enhanced by extraction procedures, was studied particularly for the BRJ juice and the roselle extract from Guatemala (Table 2). For the roselle extract, anthocyanin degradation is only 1.5 times higher at 7.5 mg/L of dissolved oxygen than at 1.5 mg/L at both 45 and

Table 2. Rate Constant k during the Thermal Degradation of Anthocyanins vs Oxygen Concentration and Temperature in Guatemala Roselle Extract, with Model Fittings at $R^2=0.98$, $P < 0.0014$, and $P_{\text{lof}}=0.15$, and BRJ, with Model Fittings at $R^2=0.98$, $P < 0.006$, and $P_{\text{lof}}=0.75^a$

O ₂ (mg/L)	T (�C)	$k \times 10^{-5}$ (1/s)	
		Guatemala roselle	BRJ
0.45	67.5	2.102 (0.023)	1.770 (0.053)
1.50	45.0	0.553 (0.001)	0.375 (0.004)
	90.0	5.980 (0.051)	3.810 (0.017)
4.50	35.0	0.585 (0.001)	0.286 (0.012)
	67.5	2.750 (0.003)	2.120 (0.005)
	98.5	7.990 (0.256)	7.514 (0.345)
7.50	45.0	0.604 (0.003)	0.557 (0.001)
	90.0	6.752 (0.008)	5.543 (0.002)
8.50	67.5	4.032 (0.002)	3.442 (0.001)

^a Numbers in parenthesis indicate the standard deviation of three analyses.

90  C. For the blackberry juice, it is only 1.1 higher under the same conditions. Meanwhile, in both cases, the k value increased almost 10 times if the temperature increased from 45 to 90  C. Dissolved oxygen appeared to have a slightly negative effect on anthocyanin stability, at least immediately after thermal treatment. Further impact during storage was not assessed. Other works showed with the juices of blueberry, cherry, current, grape, and strawberry that oxygen and temperature were the most specific accelerating agents (14). The effect of oxygen can be explained either by a direct oxidation mechanism or through oxidized compounds that react with anthocyanins to give colorless or brown products. Packaging under nitrogen increased the stability of powdered dyes based on phenolic molecules by slowing the oxidation reactions (1).

Pressed juices show quite different stability from petals extracts. This may be caused by enzymatic activity. In fact, anthocyanins can be degraded by a number of enzymes found in plant tissue such as peroxidases, polyphenoloxidases, and β -glucosidases (1, 14). The glucosidases hydrolyze the pigments to sugars and anthocyanidins. The latter are unstable and degrade to colorless derivatives or perhaps become part of the polymeric colored compounds. In our case, the enzymatic degradation of anthocyanins could only take place at temperatures below 60  C.

Model Validation and Predictions. The isothermal kinetic parameters corresponding to eqs 1–3 for the three models Arrhenius, Eyring, and Ball are presented in Table 3. All three models were observed to fit well with the temperature dependence of k and D ($0.916 < R^2 < 0.996$).

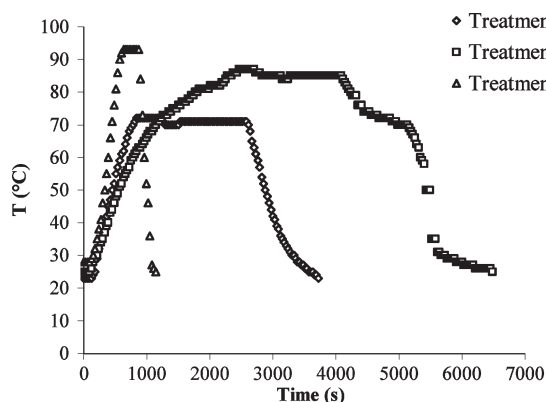
Blood orange juice and roselle cv. Thai extract with values of 66 and 61 kJ/mol, respectively, showed the highest activation energies. Increased temperature will therefore degrade anthocyanins more rapidly in these products than in the other juices or extracts. The degradation rate of anthocyanins from the blackberry juices was less affected by temperature increase than those from blood orange juice and roselle extracts, according to the z value and enthalpy of activation ΔH^* (Table 3). From this point of view, anthocyanins from blackberry appeared less heat sensitive than the other plant extracts with a stability that was two times higher than that reported previously for a different blackberry variety (*R. fruticosus*) (25). The lower acidity and, eventually, the presence of other compounds in tropical highland blackberry may explain this difference. For the roselle cv. Thai extract and blood orange juice, values of activation energy agreed with those found by other authors (23, 24, 27).

Table 3. Kinetic Parameters for Thermal Degradation of Anthocyanins, Following Different Models^a

	Arrhenius model			Eyring model			Ball model		
	$k_{\infty} \times 10^3$ (1/s)	E_a (kJ/mol)	R^2	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol.K)	R^2	$D_0 \times 10^6$ (s)	z (°C)	R^2
blood orange	324 (14.8)	66.04 (1.64)	0.988	63.11 (0.73)	-149 (1.56)	0.987	7.4 (1.05)	36 (1)	0.986
blackberry									
reference	0.015 (0.003)	36.99 (0.40)	0.964	34.24 (0.50)	-232 (1.53)	0.961	1.2 (0.04)	57 (1)	0.981
pulpy	0.013 (0.002)	37.23 (0.32)	0.954	34.48 (0.32)	-233 (1.02)	0.916	1.6 (0.02)	56 (1)	0.948
roselle extract									
Guatemala	1.336 (0.095)	51.12 (1.56)	0.953	48.31 (0.45)	-194 (3.89)	0.976	4.6 (0.89)	43 (1)	0.938
Koor	1.211 (0.810)	49.94 (1.55)	0.990	47.19 (1.55)	-195 (4.47)	0.989	3.7 (0.47)	42 (1)	0.982
Vimto	0.371 (0.078)	47.48 (0.72)	0.980	44.72 (0.71)	-205 (1.83)	0.978	4.3 (0.37)	44 (1)	0.989
Thai	44.20 (0.56)	61.60 (2.64)	0.996	58.78 (2.65)	-165 (1.43)	0.987	14.5 (1.57)	34 (1)	0.994

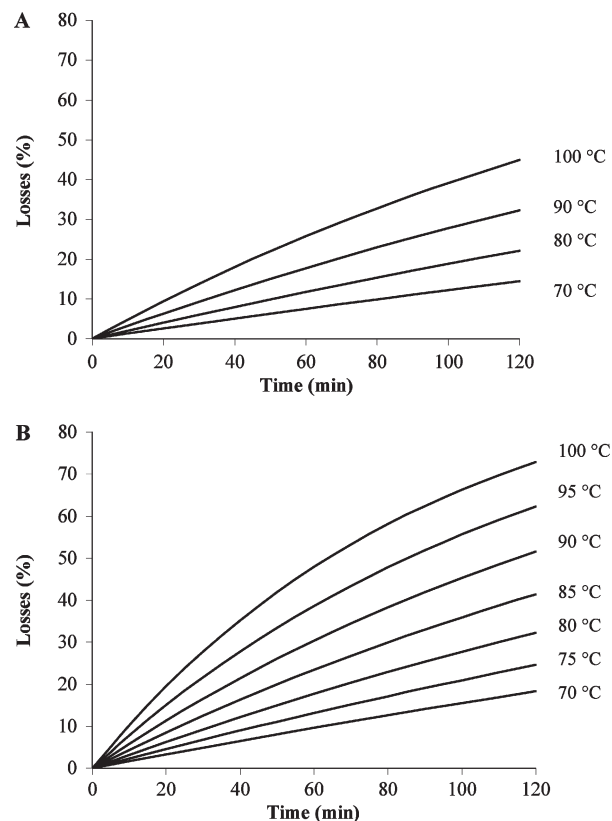
^a Numbers in parentheses indicate the standard deviation of three analyses.**Table 4.** Experimental and Calculated Losses of Anthocyanins as Compared to Different Isothermal and Nonisothermal Treatments of Roselle Cv. Vimto Extract

Isothermal						
thermal treatment		losses (%)				
T (°C)	t (min)	experimental ^a	Arrhenius model	Eyring model	Ball model	
35	60	1.0 (0.3)	1.2	1.2	1.2	
75	30	4.3 (0.2)	4.9	4.8	4.6	
85	30	6.6 (0.5)	7.7	7.6	7.6	
85	120	28.8 (0.5)	27.3	27.0	27.2	
85	240	49.9 (0.4)	47.2	46.7	47.0	
90	90	24.4 (0.6)	25.8	25.5	26.5	
Nonisothermal (Figure 2)						
T_{setup} (°C)	t_{setup} (min)	$F_{70^\circ\text{C}}$ (min)	experimental ^a	Arrhenius model	Eyring model	Ball model
thermal treatment		losses (%)				
70	30	42	6.4 (0.5)	5.4	5.4	5.3
85	30	1309	13.4 (0.1)	16.3	16.2	16.8
90	5	1070	2.0 (0.5)	3.0	3.0	3.2

^a Numbers in parentheses indicate the standard deviation of three analyses.**Figure 2.** Time and temperature profile used to validate the models using roselle cv. Vimto extract. Treatment 1, stage at 70 °C at 30 min, $F_{70^\circ\text{C}}$ value = 42 min; treatment 2, stage at 85 °C at 30 min, $F_{70^\circ\text{C}}$ value = 1309 min; and treatment 3, stage at 90 °C at 5 min, $F_{70^\circ\text{C}}$ value = 1070 min.

To compare the accuracy of the three models in predicting experimental results, additional trials were performed at different isotherms for roselle cv. Vimto extract. Experimental losses were then compared with calculated values (Table 4). In all cases, the three models gave similar results, with estimates being close to the experimental values. Model accuracy was thus verified, and the approach followed in this study was validated for isothermal treatments.

The accuracy of the models was also assessed for nonisothermal treatments, simulating real heating processes. Hence, three

**Figure 3.** Examples of estimated anthocyanin losses during isothermal treatments at different temperatures using the Eyring model. (A) Roselle cv. Vimto extract. and (B) blood orange juice.

treatments with different time and temperature profiles were tested (Figure 2). Treatment 1 (30 min at 70 °C) simulated classic low-temperature pasteurization; treatment 2 (30 min at 85 °C) simulated pasteurization at a higher temperature and longer residence time; and treatment 3 (5 min at 90 °C) simulated a flash pasteurization at a high temperature. Different $F_{70^\circ\text{C}}$ values were calculated, and experimental losses were analyzed and compared with predicted values (Table 4). As with the isothermal treatment, all models gave similar results, and estimates were close to experimental values.

Under isothermal conditions, anthocyanin losses for roselle cv. Vimto extract and blood orange juice estimated for instance by the Eyring model are plotted in Figure 3. Classic pasteurization does not significantly damage anthocyanins, with estimated losses being less than 5% for 5 min of pasteurization at 85 or 90 °C. Also, the prediction of anthocyanin losses for a given $F_{70^\circ\text{C}}$ value at different setup temperatures can be easily calculated by the

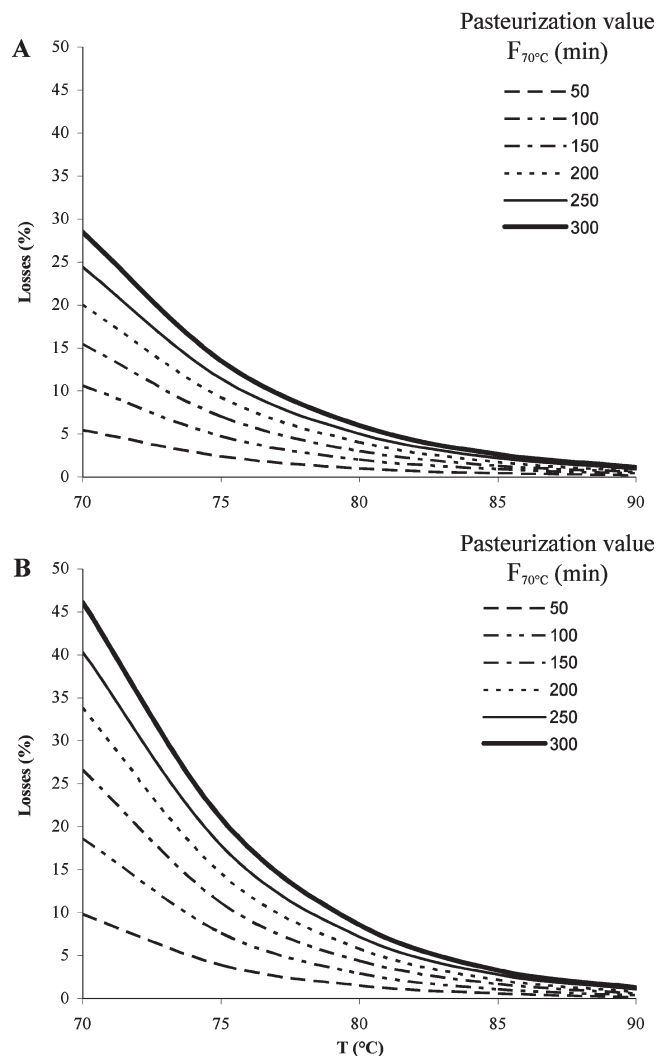


Figure 4. Estimated anthocyanin losses during isothermal treatments with varied setup temperatures and different $F_{70^{\circ}\text{C}}$ values using the Eyring model. (A) BRJ and (B) roselle cv. Thai extract.

models, as shown in **Figure 4**. For example, for $F_{70^{\circ}\text{C}}$ values between 100 and 200 min, typically used for thermal treatment of fruit beverages, temperatures above 80 °C maintained the losses of anthocyanins at the end of the process below 10% for both the BRJ and the roselle cv. Thai extract.

Our study evaluated the impact of temperature (30–90 °C) on anthocyanins degradation in blood orange juice, two tropical highland blackberry juices, and four roselle extracts. The data show that the thermal degradation of the anthocyanins can be described using first-order reaction kinetics. Variation of degradation rate constants with temperature and time can be described using as well the Arrhenius, Eyring, or Ball equations. Anthocyanins in blood orange juice had the highest rate constant for degradation, followed by the blackberry juices and roselle extracts. For the blackberry juices, a high SIS content provided only slight protection against anthocyanin degradation. The effect of the temperature seems to be predominant on the deterioration of anthocyanins than the effect of dissolved oxygen. Using kinetic parameters, Arrhenius, Ball, and Eyring models were developed to predict the losses of anthocyanins during heat treatment. Model accuracy in isothermal and anisothermal treatment conditions was verified. These models could easily be used as tools to predict losses during different heat treatments. The sensitivity of anthocyanins in the various products may be explained

by the chemical composition, dissolved oxygen content, and anthocyanin structure. However, this study on real products was not able to separate the effects of the structure and the effect of the food matrix, which will require further studies on model solutions.

ACKNOWLEDGMENT

We are also most grateful to Vanesa López for her technical assistance.

Supporting Information Available: Table of isothermal kinetic parameters k and D vs temperature for the thermal degradation of anthocyanins in blackberry and blood orange juices and roselle extracts and figure of rate constant k (1/s) during the thermal degradation of anthocyanins vs oxygen concentration and temperature. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

LITERATURE CITED

- (1) Malien-Aubert, C.; Amiot-Carlin, M. J. Pigments phénoliques—Structures, stabilité, marché des colorants naturels et effets sur la santé. In *Les Polyphénols en Agroalimentaire*; Lavoisier: Paris, 2006; pp 295–339.
- (2) Mertz, C.; Cheynier, V.; Günata, Z.; Brat, P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8616–8624.
- (3) Mazza, G. Health aspects of natural colors. In *Natural Food and Colorants Science and Technology*; Francis, G. J. L. F. J., Ed.; Marcel Dekker: New York, 2000.
- (4) Cemeroglu, S.; Isik, V. S. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 1216–1218.
- (5) Pouget, M. P.; Vennat, B.; Lejeune, B.; Pourrat, A. Extraction analysis and study of the stability of Hibiscus anthocyanins. *Lebensm. Technol.* **1990**, *23*, 103–105.
- (6) Wong, P.-K.; Yusof, S.; Ghazali, H. M.; Man, Y. B. C. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutr. Food Sci.* **2002**, *32*, 68–73.
- (7) Cisse, M.; Dornier, M.; Sakho, M.; Ndiaye, A.; Reynes, M.; Sock, O. Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): Composition et principales utilisations. *Fruits* **2009**, *64*, 179–193.
- (8) Benvenuti, S.; Pellati, F.; Melegari, M.; Bertelli, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, 164–169.
- (9) Wu, X.; Prior, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2589–2599.
- (10) Krifi, B.; Metche, M. Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2000**, *35*, 275–283.
- (11) Beattie, J.; Crozier, A.; Duthie, G. G. Potential health benefits of berries. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2005**, *1*, 71–86.
- (12) Stintsing, F. C.; Reinhold, C. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 19–38.
- (13) Wrolstad, R. E. Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, 419–425.
- (14) Francis, F. J. Food colorants: Anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, *28*, 273–312.
- (15) Özkan, M. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chem.* **2002**, *78*, 499–504.
- (16) De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. *Food Chem.* **2007**, *103*, 935–943.
- (17) Ruenroengklin, N.; Sun, J.; Shi, J.; Xue, S. J.; Jiang, Y. Role of endogenous and exogenous phenolics in litchi anthocyanin degradation caused by poly-phenol oxidase. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1253–1256.

- (18) Mulinacci, N.; Romani, A.; Pinelli, P.; Gallori, S.; Giaccherini, C.; Vincieri, F. F. Stabilisation of natural anthocyanins by micellar Systems. *Int. J. Pharm.* **2001**, *216*, 23–31.
- (19) Kirca, A.; Özkan, M.; Cemeroglu, B. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chem.* **2007**, *101*, 212–218.
- (20) Daravingas, G.; Cain, R. F. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model systems. *J. Food Sci.* **1968**, *33*, 138–142.
- (21) Morais, H.; Ramos, C.; Forg  cs, E.; Cserh  ti, T.; Oliveira, J. Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **2002**, *770*, 297–301.
- (22) García-Viguera, C.; Zafrilla, P.; Romero, F.; Abell  n, P.; Art  s, F.; Tomás-Barber  n, F. A. Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 243–247.
- (23) Gradinaru, G.; Biliaderis, C. G.; Kallithraka, S.; Kefalas, P.; García-Viguera, C. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: Effects of copigmentation and glass transition. *Food Chem.* **2003**, *83*, 423–436.
- (24) Aurelio, D.-L.; Gabriel, R.; Navarro-Galindo, E. S. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. “Criollo”) infusion. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 322–325.
- (25) Wang, W.-D.; Xu, S.-Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *J. Food Eng.* **2007**, *82*, 271–275.
- (26) De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2007**, *8*, 347–352.
- (27) Kirca, A.; Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chem.* **2003**, *81*, 583–587.
- (28) Dhuique-Mayer, C.; Tbatou, M.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dornier, M.; Amiot, M. J. Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: Kinetics and newly formed compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4209–4216.
- (29) Cisse, M.; Dornier, M.; Sakho, M.; Diop, C. M.; Reynes, M.; Sock, O. La production du bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au Sénégal. *Fruits* **2009**, *64*, 111–124.
- (30) AOAC. *Fruits and Fruits Products*; K. Helrich: Arlington, United States, 1990.
- (31) Vaillant, F.; Millan, A.; Dornier, M.; Decloux, M.; Reynes, M. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *J. Food Eng.* **2001**, *48*, 83–90.
- (32) Georgé, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1370–1373.
- (33) Kacem, B.; Marshall, M. R.; Mathews, R. F.; Gregory, J. F. Simultaneous analysis of ascorbic and dehydroascorbic acid by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and UV absorbance. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 271–274.
- (34) Brause, A. R.; Woollard, D. C.; Indyk, R. E. Determination of total vitamin C in fruit juices and related products by liquid chromatography-inter-laboratory study. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 367–374.
- (35) Englyst, H. N.; Cummings, J. H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst* **1984**, *109*, 937–942.
- (36) Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1269–1278.
- (37) Babalola, S. O.; Babalola, A. O.; Aworh, O. C. Compositional attributes of the calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *J. Food Technol. Africa* **2001**, *6*, 133–134.
- (38) Maiga, A.; Diallo, D.; Bye, R.; Paulsen, B. S. Determination of some toxic and essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2316–2321.
- (39) Laleh, G. H.; Frydoonfar, H.; Heidary, R.; Jameei, R.; Zare, S. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four Berberis species. *Pak. J. Nutr.* **2006**, *5*, 90–92.
- (40) Jackmann, R. L.; Smith, J. L. Anthocyanins and betalains. In *Natural Food Colorants*; Hendry, G. A. F., Houghton, J. D., Eds.; Blackie Academic and Professional: London, 1996; pp 244–280.
- (41) Shenoy, V. R. Anthocyanins—Prospective food colours. *Curr. Sci.* **1993**, *64*, 575–579.
- (42) Debicki-Posp  , J.; Lovri, T.; Trinajsti, N.; Sablj  , A. Anthocyanin degradation in the presence of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *J. Food Sci.* **1983**, *48*, 411–416.
- (43) Wrolstad, R. E.; Skrede, G.; Lea, P.; Enersen, G. Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 1064–1065.
- (44) Choi, M. H.; Kim, G. H.; Lee, H. S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 753–759.
- (45) Kirca, A.; Özkan, M.; Cemeroglu, B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chem.* **2006**, *97*, 598–605.
- (46) Mazza, G.; Miniati, E. Anthocyanin in fruits. *Vegetables and Grains*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1993; p 362.

Received March 13, 2009. Revised manuscript received May 28, 2009. Accepted May 29, 2009. We thank for their financial support the research network “Génie des procédés appliqué    l’agro-alimentaire” of the “Agence Universitaire de la Francophonie” (www.gp3a.auf.org) and the PAVUC-FP6-INCO project DEV-2, contract 015279 (www.pavuc.soton.ac.uk).

1-3- Étude de la stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*

Les anthocyanes en solution aqueuse présentent une stabilité limitée. Sans que les mécanismes réactionnels ne soient toujours bien identifiés, il est fréquent de constater de rapides modifications de la couleur sur des extraits anthocyaniques. La stabilité des extraits est néanmoins un critère de qualité essentiel pour ce type de produit. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a été menée pour caractériser les cinétiques d'évolution des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* au cours du stockage à différentes températures. De plus, l'effet de la température d'extraction sur la dégradation des anthocyanes et de la couleur dans l'extrait aqueux n'a pas encore été abordé à notre connaissance.

L'objectif de ce travail présenté dans la publication n° 4 est de déterminer les paramètres cinétiques de la dégradation des anthocyanes *H. sabdariffa* au cours du stockage à des températures comprises entre 4 et 45 °C. Les 3 modèles cinétiques précédemment décrits sont utilisés (Arrhenius, Ball et Eyring). L'étude cinétique est réalisée sur plusieurs extraits obtenus à différentes températures d'extraction (30 et 100 °C) avec ou sans traitement de pasteurisation (90 °C / 5 min). Les indices de couleur tels que la densité colorante, la force colorante et l'indice brun ont été également suivis durant le stockage en fonction du prétraitement subi par le produit.

Des différences significatives au seuil de 95 % ont été observées au niveau des teneurs en extrait sec soluble, en acidité titrable, sucres, vitamine C, de la densité de couleur, de l'indice brun, de la teneur en anthocyanes et du pouvoir antioxydant entre les extraits aqueux obtenus à 30 °C et à 100 °C. Le traitement de pasteurisation engendre sur les tous les extraits des pertes de 35 à 45 % pour les sucres et de 10 % pour la force colorante. Les pertes en anthocyanes sont inférieures à 5 % et sont en adéquation avec les résultats présentés dans la publication n° 3. Les conditions d'extraction ont un effet significatif sur la composition de l'extrait. Une augmentation de la température d'extraction de 30 à 100 °C entraîne une augmentation de la teneur en anthocyanes et de la densité de couleur de +24 % et + 7 % respectivement.

Au cours du stockage les teneurs en anthocyanes et les paramètres de couleur évoluent en fonction du temps et de la température pour tous les extraits. La dégradation des anthocyanes et l'évolution des indices de couleur pendant le stockage peuvent être décrits via un modèle cinétique de premier ordre. Les constantes de vitesse k sont comprises entre 0,578 et $1,967 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ à des températures de stockage allant de 4 à 45 °C dans le cas de l'extrait obtenu à 30°C et non pasteurisé (E30). L'extrait E30 est le plus stable, bien qu'il possède la plus forte teneur en oxygène dissous (7,5 mg.L⁻¹). L'effet de la température est prédominant sur la dégradation des anthocyanes par rapport à l'effet de l'oxygène dissous. L'influence de la température sur les constantes de vitesse est décrite par les modèles d'Arrhenius, de Ball et d'Eyring avec des coefficients de corrélation compris entre 0,985 et 0,998. Les paramètres cinétiques k_{∞} , E_a , D_0 , z , ΔH^* et ΔS^* ont été déterminés graphiquement pour les anthocyanes et l'ensemble des paramètres de couleur.

Pour l'indice brun, la pasteurisation augmente les valeurs de l'énergie d'activation (E_a) et de l'enthalpie (ΔH^*) respectivement de 10 % et 11 % mais semble ne pas avoir d'effet sur la force colorante. Par contre, la température d'extraction a un effet important sur l'ensemble des paramètres cinétiques aussi bien pour les anthocyanes que pour les indices de couleur. Les anthocyanes et paramètres de couleur de l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*, sont dégradés beaucoup plus rapidement durant le stockage à des températures comprises entre 4 et 45 °C lorsque la température d'extraction est élevée.

Cette étude sur la stabilité des anthocyanes et l'évaluation des propriétés colorantes de différents extraits d'*Hibiscus sabdariffa* vient compléter l'étude effectuée sur la dégradation thermique des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*. Elle va nous permettre de définir au mieux les conditions idéales de température pour produire un extrait doté d'une bonne stabilité au cours du temps à partir de calices d'*Hibiscus sabdariffa* et d'eau à des proportions optimums à définir durant l'optimisation de l'extraction aqueuse des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*.

Publication n° 4
Anthocyanins and Color Degradation Kinetics
of Roselle Extracts During Storage

Soumis au Journal of Agricultural and Food Chemistry

Anthocyanins and Color Degradation Kinetics of Roselle Extracts During Storage

Cisse M.¹, Vaillant F.^{2,3}, Kane A.¹, Ndiaye O.¹, Dornier M.^{*,2}

¹Ecole Supérieure Polytechnique, Université Cheikh Anta Diop, B.P. 5085, Dakar Fann, Sénégal

²UMR QUALISUD, CIRAD, Montpellier SupAgro, 73 rue J.F. Breton, TA B-95/16, F-34398 Montpellier cedex 5, France

³Centro de Investigación de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Código Postal 2060, San José, Costa Rica.

* Author to whom correspondence should be addressed (phone+33/467614432; fax +33/467614433; e-mail dornier@cirad.fr).

ABSTRACT

The effect of storage on the stability and visual color of four aqueous anthocyanin extracts from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) was investigated over the temperature range from 4 to 45 °C. Analysis of kinetic data showed first-order kinetics for the degradation of anthocyanins, the variation of color density, color strength and Browning index. The rate constant and isothermal kinetic parameters were calculated according to three models: Arrhenius, Eyring and Ball. Model accuracy was verified, and the approach followed in this study was validated for isothermal storage during 6 months at 4 to 45 °C. Anthocyanins in extract obtained at 100 °C then pasteurized at 90 °C/5 min presented the highest rate constant for degradation for all temperature storage. At 30 °C, the half-lives for anthocyanins were 56, 41, 39 and 38 days for the extract obtained at 30 °C, extract obtained at 30 °C then pasteurized, extract obtained at 100 °C, and extract obtained at 100 °C then pasteurized respectively. Values of activation energies were from 22 to 26 kJ.mol⁻¹, 18 to 25 kJ.mol⁻¹, 22 to 31 kJ.mol⁻¹ and 20 to 34 kJ.mol⁻¹ for the anthocyanins, color density color intensity and Browning index respectively. Storage temperature has a strong effect on the anthocyanins degradation and on the development of non-enzymatic browning product that increases the Browning index of roselle extract.

KEYWORDS: *Hibiscus sabdariffa*, anthocyanins, aqueous extracts, stability, color, kinetics

INTRODUCTION

The anthocyanins are the largest group of water-soluble pigments in the plant. They are highly appreciated in the food industry for their coloring properties, which can give food various hues of red and violet. Many edible plants are sources of anthocyanins (172-175). These include roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.) (176-178).

Roselle calyx contains high amounts of anthocyanins that can be as high as 2.5 g/100 g DW. The calyx contains two main anthocyanins: delphinidin-3-sambubioside or delphinidin-3-xylosylglucoside or hibiscin and cyanidin-3-sambubioside or cyanidin-3-xylosylglucoside or gossypicyanin, and two minor anthocyanins, delphinidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside. Roselle, an annual shrub also called bissap in Senegal, grows in regions where dry tropical weather prevails; countries like Sudan, Thailand, China, Mexico, Egypt, Senegal and Tanzania (179).

In these countries, its shrubbery is used for decorative purposes; in others, seeds and petals are used for human consumption. Nevertheless, in most cases, it is cultivated with the purpose of using the calyx of their flowers to produce refreshing beverage or infusions that are drunk as a tea. The infusion obtained by thermal treatment (100 °C for 3 min) of dehydrated calyx suspended in water, showed higher antioxidant properties than the one obtained in cold treatment (25). The refreshing beverage commonly obtained by aqueous extraction with cold or boiling water and mixed with some few ingredients like sugar, fruit juices, and sweetener, is an intense red liquid that shows a low pH and an acidic flavor. The extraction procedure has duration and temperature variables according to the varieties, the desired degree of acidity and the culinary customs of the regions where it is consumed.

Quality characterization of anthocyanin extracts is based mainly on measurements of their visible spectra. An important parameter derived from them is the color tonality (CT) which defines the proportion of the red brownish to the red colors ($CT = A_{420}/A_{520}$) (174). Other spectral derivatives, such as the Browning index (A_{430}/A_{520}), the color density ($A_{430} + A_{520} + A_{580}$), color intensity and the Violet index (A_{580}/A_{520}) indices are also used (174, 180-182).

However, several works showed that anthocyanins, the pigments responsible for color are also degraded during the process (183-185). Gradinaru et al. (2003) evaluated the kinetics of the decomposition of the isolated anthocyanins in model aqueous solution. The degradation kinetics of anthocyanins in roselle infusion and roselle extract were studied by Aurelio et al (2008) and Cisse et al (2009c) between 60-100 °C and 30-90 °C respectively. Results showed that rate constants for anthocyanins degradation with respect to temperature can always be assumed to follow a first-order reaction. So, Cisse et al. (184) compared the classical empirical approaches (Arrhenius and Ball models) and an approach based on statistical thermodynamics (Eyring). The ability of these three models to describe the thermal degradation kinetics of anthocyanins and color properties was improved.

However, until now, no studies have been carried out to analyze the evolution of the anthocyanins during storage of the roselle extract as a function of temperature integrating the impact of the extraction procedure. Furthermore, no study of the effect of extraction temperature on the degradation of anthocyanins and color of roselle is known. Only one study (184) looked at the anthocyanins degradation of roselle using the Ball, Eyring and Arrhenius models. In that sense, the aim of this work was first to determine the kinetics parameters of anthocyanin degradation during storage at various temperatures using three kinetical models: Arrhenius, Ball and Eyring and secondly to evaluate coloring properties of different roselle extract. The final purpose is to define the ideal conditions for producing a refreshing beverage without losing its antioxidant properties with a good stability for as long as possible.

MATERIALS AND METHODS

A complete factorial design 2^2 was applied with two discrete factors "extraction" (E) and "pasteurisation" (P). Low level (L1) of factor 1 "extraction" was extraction at low temperature 30°C/240 min, high level (L2) was extraction at 100°C during 30 min. Factor 2 "pasteurisation" had also two levels, with pasteurisation 100 °C/5 min (L2) or without pasteurization (L1).

Preparation of the extracts

To prepare the roselle extract, dried calyces from Senegal Thai variety were mixed with cool or hot demineralized water at a mass ratio of calyx to water of 1:15 (**Table 1**). The extract was then successively filtered through a stainless steel sieve (1 mm) and a bag filter system made with polyester and 5 µm of micron rating (GAF, Belgium). In the filtered extract, potassium sorbate and sodium benzoate were added at concentration of 0.09 and 0.07 %, respectively to prevent microbial development during storage (182). The packaging was then done manually in amber-sealed bottles (60 mL).

The pasteurization for the E 30-P and E 100-P extract was realized in a thermostatic water bath without agitation (Memmert, Schwabach,, Germany) adjusted to 92 °C. A Heidolph EKT 3001 digital temperature controller (± 1 °C), fitted to a filed sealed bottle, was used as a control to measure the product temperature during experiments. After the treatment, the bottles were immediately cooled by submersion in an ice bath. All trials and measurements were done in triplicate

Stability during storage

The storage stability of the four anthocyanin extracts was studied at 4, 20, 30, 37 and 45 °C. For 4 °C a refrigerated incubator was used (Hoelzle & Chelius HC, Germany). For 20 °C a cooled chamber (LIEBHERR, Germany) was used, while the storage at 30, 37 and 45 °C was done in stoves (Memmert, Schwabach, Germany). Samples were analyzed for 14 days each, during 182 days with respect to pH, titratable acidity, total anthocyanins, color density, color intensity and Browning index. All trial and measurements were done in triplicate.

Analyses

All extracts were analyzed for pH, titratable acidity, and density using standard methods. The total soluble solids (TSS) content was measured with an Abbe refractometer (Atago, Japan), Vitamin C (ascorbic acid and dehydroascorbic acid) was assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (186) using an Agilent 1100 system (Massy, France). Sucrose, fructose, and glucose were determined according to (35).

The total anthocyanin content was assessed by the pH differential method (162). All absorbance readings were done against distilled water, which acted as the control. Spectrophotometric measurements were carried out using Shimadzu spectrophotometers (UV-1605, Kyoto, Japan). Concentrations were expressed as delphinidin 3-xylosylglucoside equivalents for roselle (MW=577 g.mol⁻¹). The molar extinction coefficient at pH 1 and 510 nm, used for calculation, was 26000 L.mol⁻¹ cm⁻¹ (184). All of the reagents used were of analytical grade and were purchased from Sigma (L'isle d'Abeau, France).

Color density (CD), color intensity (CI) and Browning index (BI) were determined by measuring absorbance at different wavelengths (174). CI is the absorbance of 1% extract solution (pH 3.0) in a 1 mm glass cell, at 520 nm while CD, is A_{430 nm} + A_{520 nm} + A_{580 nm} of 1% solution, 1 cm glass cell, pH 3.0. The Browning Index is A_{430 nm}/A_{520 nm}.

Visible spectra of samples were determined by scanning the absorbance between 400 and 700 nm. Quartz cuvettes of 1 mm path-length were used and all measurements were carried out at laboratory temperature (23 °C). Absorbance readings were made against distilled water as a blank.

Antioxidant Capacity Anoxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was done in accordance with Ou et al (164), using a microplate spectrofluorimeter with 96-well plates made in black polypropylene (165). The ORAC value was expressed as Trolox equivalents (μmol.g⁻¹). Total flora, yeasts, and moulds were assessed using standard methods (187).

Degradation Kinetics Modeling

Assuming first-order kinetics for anthocyanins degradation and color variation, the model's parameters were identified, using linear regressions on the logarithmic curves of experimental data following the three models chosen. The anthocyanins, color density, color intensity and browning index variation during storage were calculated from the general expressions (eqs 4-6):

$$\text{Arrhenius} \quad \ln \left(\frac{C}{C_0} \right) = -k_a \int e^{\left(\frac{E_a}{RT} \right)} dt \quad (4)$$

$$\text{Ball} \quad \log_{10} \left(\frac{C}{C_0} \right) = -\frac{1}{D_0} \int 10^{(T/t_2)} dt \quad (5)$$

$$\ln \left(\frac{C}{C_0} \right) = \frac{k_B}{h} e^{(\Delta S^\ddagger / R)} \int T e^{[-(\Delta H^\ddagger) / RT]} dt \quad (6)$$

Eyring

with T the temperature (K or °C), k_∞ = pre-exponential factor (s^{-1}), E_a = activation energy ($J.mol^{-1}$), R = gas constant = $8.31 J.mol^{-1} K^{-1}$, ΔH^\ddagger = activation enthalpy ($J.mol^{-1}$), ΔS^\ddagger = activation entropy ($J.mol^{-1}.K^{-1}$), k_B/h = Boltzmann and Planck constants ratio = $2.084 \times 10^{10} K^{-1}.s^{-1}$, D_0 = decimal reduction time at $T = 0^\circ C$ (s), and z factor ($^\circ C$).

Optimizing thermal processing to improve the product color requires data on color degradation kinetics and temperature dependence that can be described by activation energy (E_a) or activation enthalpy (ΔH^\ddagger) or z factor ($^\circ C$). First-order kinetic models have been used to evaluate the appearance of browning, the color density and the color strength

An analysis of variance (ANOVA) was obtained by the XLSTAT (Version of Release 10) statistical computer programme. Tukey's multiple range taste was used to obtain comparisons among sample means. Evaluations were based on the $P < 0.05$ significance level.

RESULTS AND DISCUSSION

1- Characteristics of the different extracts

The main physicochemical properties of the extract at $30^\circ C$ (E 30), extract at $30^\circ C$ pasteurized (E 30-P), extract at $100^\circ C$ (E 100) and extract at $100^\circ C$ pasteurized (E 100-P) are shown in **Table 2**. Significant differences at level of 95 % in total soluble solid content, titratable acidity, sucrose, glucose, fructose, vitamin C, color density, browning index, anthocyanin content and ORAC were noted between the extracts at $30^\circ C$ and $100^\circ C$ but no difference was noted for color strength. An increase of at least 15% and 30 % is observed when the extraction temperature increases from 30 to $100^\circ C$ for the total soluble solids, sugars and anthocyanin respectively.

The pasteurization at $90^\circ C$ during 5 min leads to a loss in terms of physical-chemical characteristics. The losses range from 35 to 45% for sugars, 6 to 8 % for the color density and around 10 % for color strength. Losses of anthocyanin are under than 5 %. These results were close to those obtained while applying the same heat treatment in previous studies (184).

Titratable acidity and pH values are almost constant during the storage for all the extracts. This could be due to the absence of microbiological or enzymatic activity. Actually plate counts for total flora, fecal coliform and yeast and molds were all negative for the various extracts, probably because of the low pH, thermal treatment and presence of food additives potassium sorbate and sodium benzoate.

Analysis of the characteristics of the experimental design and effects of the different parameters (**Table 3**) shows that the extraction conditions and pasteurization have a significant effect on the different parameters. In fact, the increase of extraction temperature

from 30 to 100 °C results in an increase of anthocyanins and color density of +24 % and + 7% respectively. Pasteurization reduces the content of anthocyanins of 4 %. And consequently a drop of 6 %, 8 % and 12 % respectively in browning index, color density and color intensity was observed. The combination of conditions of extraction and pasteurization produces no effect on the parameters.

2- Anthocyanin degradation during storage

2-1- Kinetics of anthocyanin degradation

Anthocyanin contents decreased during storage according to time and temperature (**Figure 1**) for all the extracts. Two phases can be distinguished. The first one, with higher reaction velocity up to 100–112 days of storage, and the second one, after 112 days of storage with lower degradation velocity. The first period with higher reaction rate corresponds probably to the effect of oxygen on the anthocyanins degradation. Similar changes were also observed by Tonon and al (188), in spray-dried açai juice produced with different carrier agents. Linear regression confirmed that the degradation of anthocyanins in the roselle extracts during storage can be fitted by a first-order reaction model (**Figure 2**). Several authors also found a first order reaction for the degradation of anthocyanins during storage in blackberry juice and concentrate of 89 and 650 g TSS.kg⁻¹ respectively (189), purple and red-flesh potatoes extracts (175), blood orange concentrates of 450 and 690 g TSS.kg⁻¹ (190) and black carrot concentrate of 45 °C and pH 4.3 (191). The first-order reaction rate constants (k) and half-lives (t_{1/2}) were calculated by the equations (7) and (8) and their values are given in **Table 4**.

$$\ln \left(\frac{C_t}{C_0} \right) = -k \cdot t \quad (7)$$

$$t_{1/2} = -\ln(0,5) \cdot k^{-1} \quad (8)$$

where C₀ is the initial anthocyanin content and C_t is the anthocyanin content after t day of storage at a given temperature.

Whatever the storage temperature is, it had a strong influence on the degradation of anthocyanins. In fact, storage at 45 °C resulted in a much faster degradation as compared to refrigerated storage at 4 °C. For example, with extract E 30 reaction rate k ranges from 0.578 to 1.967 x 10⁻⁷ s⁻¹ to respective storage temperatures of 4 and 45 °C . The t_{1/2} values of roselle anthocyanins for E 30-P were 115 days at 4 °C, 34 days at 37 °C and only 28 days at 45 °C. At temperature of 37 °C, the t_{1/2} values of anthocyanins were reported to be between 7 and 16 days for black carrot anthocyanins in various juices to 90 at 260 g TSS.kg⁻¹ (192), 12 and 9 days in blackberry juice at 89 and 650 g TSS.kg⁻¹ (189), 28 days in black carrot juice at 640 g TSS.kg⁻¹ (191), 2 and 3.1 days in blood orange juice at 450 and 690 g TSS.kg⁻¹ (190). The t_{1/2} values for anthocyanins degradation in strawberry juice and concentrate of 650 g TSS.kg⁻¹ were 8 days and 4 days at 25 °C (193). These observations clearly indicate that anthocyanins

from roselle have greater stability than those from blood orange, purple carrot, blackberry and strawberry during storage.

One of the few studies on the stability of roselle anthocyanins was carried out by (185) who reported that the $t_{1/2}$ values of free and encapsulated roselle anthocyanins stored at 40 °C under light exposure and activity of water at 0.84 were 3.9 and 6.0 days respectively. These differences can be explained by the effect on the light, the chemical composition and the pH of the different matrixes (172, 184, 191, 194-196).

The extraction conditions (temperature, time) and pasteurization also show a large dependence of the stability of anthocyanins during storage (Table 3). Increasing extraction temperature and pasteurization has a strong effect on the kinetics value of anthocyanins. Indeed, the k_{∞} increases of 124 % and 62 % respectively for extraction and pasteurization when going from level L1 to L2. The effect of extraction temperature seems to be predominant than the effect of pasteurization on the stability of *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins during storage at 4 to 45 °C.

2-2- Model validation and predictions

Effect of the storage temperature on the anthocyanins degradation rate constant is shown in Figure 3 using the Arrhenius plot. The isothermal kinetic parameters for the Arrhenius, Eyring, and Ball models are presented in Table 5. All three models were observed to fit well with the temperature dependence of k and D ($0.981 < R^2 < 0.998$). The activation energies vary between 22.6 and 26.3 kJ.mol⁻¹ with the highest value obtained for the extract obtained at 100 °C and pasteurized (E 100-P). High temperature treatment of the extract tends to make anthocyanin more sensitive to degradation as its content decreases more rapidly. The degradation rate of anthocyanins from the extract E 30 was less affected by temperature increase than those from roselle extracts at 100 °C, according to the z value and enthalpy of activation ΔH^* . From this point of view, anthocyanins from extract at 30 °C appeared less sensitive during storage than the other extracts. The extract E 30 is the most stable, although it is the richest in dissolved oxygen (Table 2). The effect of the temperature seems to be predominant on the deterioration of anthocyanins than the effect of dissolved oxygen. These results are consistent with those of Cisse et al.(184).

Moreover, no significant difference was noted between the values of E_a , ΔH^* , ΔS^* and z in the extracts E 30-P, E 100 and E 100-P. This result confirms that the effect of extraction temperature is more significant than the effect of pasteurization treatment, probably due to the shorter time of exposure to heat. The activation energies of roselle anthocyanins during storage are lower than those resulting from heating between 30 and 90 °C (184). These values were found to be between 47 and 61 kJ.mol⁻¹ depending on the variety of roselle. Similar results were also found in blood orange juice (197), in purple carrot (198) and in blackberry juice and concentrate (189).

To compare the accuracy of the three models in predicting experimental results, additional trials were carried out at storage temperature of 10, 25, 40 and 45 °C for all the roselle extracts. Experimental losses were then compared to calculated values (**Table 6**). In all cases, the three models gave similar results, with estimates being close to the experimental values. Model accuracy was thus verified, and the approach followed in this study was validated for isothermal storage during 6 months at 4 to 45 °C.

3- Color parameters variation during storage

3-1- Kinetics of color parameters degradation

The purpose was to examine the influence of prolonged storage at different temperatures from 4 to 45 °C on color of different extracts elaborated from roselle calyx

Such as anthocyanin degradation, color parameters during storage were fitted to first-order reaction kinetics (Figure 4-6). The values of the first-order model are given in table 7 for the color density, color intensity and Browning index. Storage temperature has a significant effect on the color parameters. For the color density, the reaction rate constant k is at least 3 times higher when the temperature varies from 4 to 45 °C regardless of the extract. Values of k ranged between 4.63 and $31.25 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ for the color intensity with an increase of at least 3.6 times when temperature increased from 4 to 45 °C. Values of D ranged between 115 and 768 days.

Absorbance at 420 nm has generally been used to determine non-enzymatic browning in fruit juices as a quick and easy method for monitoring the extent of the reaction (199-201). Isothermal storage of all roselle extracts samples progressively resulted in extract darkening and formation of brown pigments as recorded by the absorbance evolution during storage (**Figure 7**). A strong impact of increasing the storage temperature on the rate of color development was observed. Similar results were obtained during the storage at 5, 20 and 37 °C of apple juice concentrates (202) and during storage of açai, blackberry and purple carrot anthocyanin extract at 20, 30 and 50 °C (182). The total pigment decreases significantly through storage, at a rate strongly dependent on temperature. Similar results were found in grape juice stored at 10, 20 and 37 °C (180). In concordance with anthocyanin degradation observed previously, the degradation of color parameters in roselle extract occurred faster with increasing storage temperature. For example, the extract E 30-P shows values of k at 4 °C of 5.79, 4.63 and $3.47 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ for color intensity, color density and Browning index respectively. At 45 °C these values were increased to 20.83, 12.73 and $12.73 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$.

3-2- Model validation and predictions

Effects of the storage temperature on the color density degradation rate constant are shown in **Figure 8** according to Eyring linear representation. This result was also observed for color intensity and Browning index.

All three models were observed to fit well with the temperature dependence of k and D (**Table 8**). The activation energies, activation enthalpies and z factors were significantly different when the extraction temperature increases from 30 to 100 °C for color density, Browning index as for the color intensity. However, for a given extract, pasteurization does not significantly affect the kinetic parameters. With Arrhenius model applied on the color density, the activation energies were 18.89 and 18.05 kJ.mol⁻¹ for the extract E 30 and E 30-P respectively. Using models, it's possible to predict the influence of storage temperature on color density, Browning index and color intensity. For example Table 9 gives experimental losses vs calculated losses using Arrhenius models. Estimates values were closed to the experimental values. Losses observed with the color intensity were more important than those calculated for the color density and the Browning index. Model accuracy was also then verified, and the approach followed in this study was validated for isothermal storage up to 6 months at 4 to 45 °C.

The extraction condition and the pasteurization also have an effect on the color parameters (**Table 3**). For browning index, pasteurization increases the values of activation energy (E_a) and enthalpy (ΔH^*) respectively of 10 % and 11 %. Pasteurization, it seems, has no effect on the kinetic parameters for color intensity. While the extraction temperature has a strong effect on the same kinetic parameters. This may be due to the formation during extraction of some reactive species which then influence the color degradation during storage. Indeed, Timberlake and Bridle suggested that the products from the sugar degradation may be part of the reaction scheme (203). The mechanism of anthocyanin degradation with temperature is not completely understood. Higher temperatures can cause changes in the anthocyanin structure. It can be suggested that higher temperatures favor chalcone formation. After ring-opening, further degradation leads to brown products. Hydroxyl groups and methoxyl groups on the B ring have an effect on color intensity and stability of anthocyanins (172, 204). The thermal treatments could also destroy protective compounds of anthocyanins making them more thermosensitive.

Absorbance values at 520 nm are 1.0, 0.8, 1.3 and 1.2 respectively for extracts E 30, E 30-P, E 100 and E 100-P. During storage of roselle extracts at different temperatures, the absorbance gradually decreases (Figure 9). This indicates a gradual loss of anthocyanins. At the same time we noted an increase in absorbance between 400 and 450 nm at storage temperatures of 30, 37 and 45 °C. It is therefore formation of brown compounds from the degradation of anthocyanins. This has resulted in an increase in the Browning index and a decrease of the color density and color intensity observed during the storage of roselle extracts.

CONCLUSION

In conclusion, our study assessed the impact of temperature during extraction of dried roselle flowers as well as short term pasteurization, on the quality of the extract obtained. Additionally, the influence of processes assessed the degradation of anthocyanins and the

evolution of color parameters during storage of extracts. When the extraction temperature rises from 30 to 100 °C, the anthocyanin content increased by 30 % as well as all other quality parameters related to anthocyanin content such as color, etc. and antioxidant capacity.

The data show that the thermal degradation of the anthocyanins can be described using first-order reaction kinetics. Variation in degradation rate constants with temperature and time during storage can be described also using the Arrhenius, Eyring or Ball equations. Anthocyanins in the extract at 100 °C then pasteurized at 90 °C during 5 min had the highest rate constant for degradation, followed by the extract at 100 °C and extract at 30 °C then pasteurized.

The effect of the extraction temperature seems to be predominant on the deterioration of anthocyanins. The roselle anthocyanin, during storage degraded more quickly when temperature of extraction is high. Thus higher stability of roselle anthocyanin extract was obtained using lower temperature during aqueous extraction. Using kinetic parameters, Arrhenius, Ball, and Eyring models were developed to predict the losses of anthocyanins during storage at 4 to 45 °C. Model accuracy in isothermal treatment conditions was verified. These models could easily be used as tools to predict losses during different storage temperature. The color settings such as color density, color intensity and Browning index follow the same trend observed for total anthocyanin content. Further studies on the stabilization of roselle anthocyanins are needed if calyx of roselle were processed into beverage or roselle anthocyanin were used as colorant in other products. These studies should be carried out on real drinks and optimal extracts to determine their optimal use-by date taking into account the microbiological and nutritional quality, the stability of anthocyanins and the color parameters during storage at temperatures between 4 and 45 °C. Extensive studies on the evolution of compositions and reaction mechanisms involved during storage following the extraction method are needed.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) and CIRAD for its financial support

TABLES

Table 1 Characteristics of the different types of roselle extracts

Extracts	Extraction parameters (Temperature : T _e / time : t _e)		Pasteurization (Temperature : T _p /time : t _p)	
	T _e (°C)	t _e (min)	T _p (°C)	t _p (min)
E 30	30	240	0	0
E 30-P	30	240	90	5
E 100	100	30	0	0
E 100-P	100	30	90	5

Table 2. Main characteristics of the different roselle extracts: numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions; values with similar letters are not significantly different (Tukey, P > 0.05).

	Extract of roselle calyx			
	E 30	E 30-P	E 100	E 100-P
pH	2,26 a (0.05)	2,30 a (0.05)	2,32 a (0.05)	2,40 a (0.05)
Dissolved oxygen (mg.L⁻¹)	7.54 a (0.25)	1.30 b (0.03)	3.54 c (0.33)	0.85 d (0.02)
Total soluble solids (g.kg⁻¹)	42 a (2)	42 a (2)	48 b (3)	47 b (3)
Titration acidity (g malic acid/kg TSS)	191 a (7)	190 a (7)	228 b (8)	227 b (8)
Sucrose (g.kg TSS⁻¹)	2.84 a (0.14)	1.70 b (0.04)	3.54 c (0.12)	2.11 d (0.11)
Glucose (g.kg TSS⁻¹)	22.95 a (0.95)	12.63 b (0.52)	26.57 c (1.10)	14.62 d (0.65)
Fructose (g.kg TSS⁻¹)	15.28 a (0.55)	9.93 b (0.41)	17.78 c (0.84)	10.65 d (0.55)
Vitamine C (g.kg TSS⁻¹)	8.33 a (0.39)	4.02 b (0.21)	6.46 c (0.24)	4.01 d (0.16)
Anthocyanin (mg.L⁻¹)	220 a (7)	218 a (8)	280 b (9)	260 c (5)
ORAC (μmol Trolox.g⁻¹)	165 a (1.15)	159 a (2.64)	241 b (4.58)	221 c (3.46)
Browning index	2.52 a (0.04)	2.33 b (0.03)	2.15 c (0.04)	2.04 d (0.05)
Colour density	33.64 a (0.07)	31.56 b (0.09)	36.27 c (0.01)	33.30 d (0.08)
Colour strength	21.69 a (0.10)	19.21 a (0.08)	21.31 a (0.07)	19.10 b (0.04)

Table 3. Characteristics of the experimental design and effects of the different parameters.

		Response	R ² of model	P of model	Significative effect of factors (p<0.005) in going level L1 to L2		
					Extraction (E) L1 to L2	Pasteurization (P) L1 to L2	E to P
Initial product after thermal treatment	Anthocyanin		0.954	< 0.001	+ 24 %	- 4 %	ns
	Browning index		0.966	< 0.001	- 16 %	-6 %	ns
	Colour density		0.963	< 0.001	+ 7 %	- 8 %	ns
	Colour intensity		0.997	< 0.001	- 1 %	- 12 %	- 1 %
Kinetics values during storage	Anthocyanins	k _∞	0.990	< 0.001	+ 124 %	+ 62 %	+ 39 %
		E _a	0.878	< 0.005	+ 8 %	+ 7 %	+ 6 %
		ΔH*	0.883	< 0.005	+ 9 %	+ 7 %	+ 5 %
		ΔS*	0.923	< 0.001	+ 3 %	+ 2 %	+ 2 %
		D ₀	0.849	< 0.005	- 22 %	- 14 %	ns
		z	0.966	< 0.001	- 8 %	- 8 %	- 8 %
	Browning index	k _∞	0.998	< 0.001	+ 1260 %	+ 208 %	+ 200 %
		E _a	0.960	< 0.001	+ 49 %	+ 10 %	ns
		ΔH*	0.929	< 0.001	+ 55 %	+ 11 %	ns
		ΔS*	0.998	< 0.001	+ 14 %	+ 3%	ns
		D ₀	0.988	< 0.001	- 1 %	- 3 %	- 1 %
		z	0.907	< 0.005	- 52 %	- 19 %	ns
	Colour density	k _∞	0.999	< 0.001	+ 1867 %	+ 124 %	+ 126 %
		E _a	0.905	< 0.005	+ 33 %	ns	ns
		ΔH*	0.951	< 0.001	ns	+ 38 %	- 7 %
		ΔS*	0.993	< 0.001	+ 8 %	ns	- 1 %
		D ₀	0.999	< 0.001	- 23 %	- 25 %	- 8 %
		z	0.896	< 0.005	ns	- 38 %	ns
	Colour intensity	k _∞	0.999	< 0.001	+ 2867 %	+ 99 %	- 95 %
		E _a	0.942	< 0.001	+ 37 %	ns	ns
		ΔH*	0.907	< 0.005	+ 41 %	ns	ns
		ΔS*	0.993	< 0.001	+ 10 %	+ 1 %	ns
		D ₀	0.999	< 0.001	+ 22 %	- 37 %	+ 16 %
		z	0.960	< 0.001	- 32 %	ns	+ 6 %

Table 4. Effect of temperature and roselle extract types on the k , $t_{1/2}$, and D values of anthocyanins degradation, numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions.

Extrait	Température (°C)	$k \times 10^{-7}$ (s ⁻¹)	$t_{1/2}$ (days)	D (days)
E 30	4	0.578 (0.002)	139	461
	20	0.983 (0.002)	82	271
	30	1.435 (0.004)	56	186
	37	1.736 (0.003)	46	154
	45	1.967 (0.003)	41	135
E 30-P	4	0.694 (0.004)	115	384
	20	1.284 (0.005)	62	207
	30	1.971 (0.002)	41	135
	37	2.372 (0.003)	34	112
	45	2.835 (0.007)	28	94
E 100	4	0.752 (0.004)	107	354
	20	1.389 (0.003)	58	192
	30	2.083 (0.004)	39	128
	37	2.662 (0.003)	30	100
	45	3.125 (0.005)	26	85
E 100-P	4	0.810 (0.004)	99	329
	20	1.458 (0.004)	55	183
	30	2.106 (0.002)	38	127
	37	2.778 (0.004)	29	96
	45	3.472 (0.005)	23	77

Table 5. Kinetic parameters for the anthocyanins degradation during storage following different models, numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions and values with similar letters are not significantly different (Tukey, $P > 0.05$).

Extract	Arrhenius model			Eyring model			Ball model		
	$k_{\infty} \times 10^{-3}$ (s ⁻¹)	E_a (kJ.mol ⁻¹)	R^2	ΔS^* (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔH^* (kJ.mol ⁻¹)	R^2	$D_0 * 10^7$ (s)	z (°C)	R^2
E 30	1.11 a (0.05)	22.66 a (0.92)	0.981	-310 a (2)	20.21 a (0.60)	0.989	4.35 a (0.2)	77 a (1)	0.990
E 30-P	5.17 b (0.21)	25.79 b (1.04)	0.993	-297 b (3)	23.33 b (0.62)	0.992	3.66 b (0.3)	67 b (1)	0.991
E 100	6.66 b (0.33)	26.20 b (0.78)	0.995	-295 b (2)	23.74 b (0.71)	0.989	3.41 b (0.2)	67 b (1)	0.990
E 100-P	7.39 b (0.44)	26.33 b (0.64)	0.998	-293 b (3)	23.87 b (0.74)	0.998	3.17 b (0.2)	67 b (1)	0.998

*

Table 6. Experimental and calculated losses of anthocyanins as compared to different isothermal treatment during storage: numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions

Storage conditions			Losses (%)			
	T (°C)	t (days)	Experimental	Arrhenius	Eyring	Ball
E 30	4	180	58.5 (2.54)	59.9	58.1	60.5
	10	90	44.9 (2.80)	43.6	41.4	42.6
	10	180	66.3 (5.55)	68.2	65.7	67.1
	25	60	44.3 (2.52)	46.2	43.9	43.9
	25	120	69.1 (4.85)	71.1	68.6	68.6
	40	30	37.9 (4.21)	38.1	36.2	36.5
	40	150	91.8 (6.71)	90.9	89.4	89.7
	45	30	42.0 (2.47)	41.9	40.3	40.9
E 30-P	4	180	65.3 (4.25)	66.6	65.7	67.5
	10	90	48.9 (1.75)	48.9	49.3	49.8
	10	180	73.2 (3.65)	73.9	74.2	74.8
	25	60	56.1 (2.48)	54.1	54.4	53.7
	25	120	80.0 (5.02)	78.9	79.2	78.6
	40	30	48.5 (3.25)	47.3	47.6	47.5
	40	150	94.8 (4.75)	95.9	96.1	96.0
	45	30	52.1 (3.15)	53.9	53.1	53.5
E 100	4	180	69.3 (5.23)	69.3	68.0	70.0
	10	90	53.8 (3.24)	54.6	51.5	52.3
	10	180	78.1 (4.68)	79.4	76.5	77.3
	25	60	58.4 (3.51)	60.	57.1	56.2
	25	120	82.5 (4.12)	84.2	81.6	80.8
	40	30	51.3 (3.57)	53.5	50.5	49.9
	40	150	95.7 (6.65)	97.8	97.0	95.9
	45	30	55.8 (4.36)	57.4	56.2	56.0
E 100-P	4	180	73.2 (5.28)	71.0	74.6	72.6
	10	90	55.5 (3.85)	52.6	53.9	54.9
	10	180	80.7 (4.84)	77.5	78.7	79.7
	25	60	59.3 (2.96)	58.3	59.5	58.9
	25	120	84.2 (5.04)	82.6	83.6	83.1
	40	30	53.1 (3.18)	51.7	52.9	52.5
	40	150	96.3 (5.76)	97.4	97.7	97.6
	45	30	61.5 (5.21)	59.4	63.2	58.7

Table 7. Effect of temperature and roselle extract on the k , $t_{1/2}$, and D of colour intensity and density and Browning index in roselle extracts: numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions

Extract	Temperature (°C)	Colour intensity			Colour density			Browning index		
		$k \times 10^{-8}$ (s ⁻¹)	$t_{1/2}$ (days)	D (days)	$k \times 10^{-8}$ (s ⁻¹)	$t_{1/2}$ (days)	D (days)	$k \times 10^{-8}$ (s ⁻¹)	$t_{1/2}$ (days)	D (days)
E 30	4	4.63 (0.13)	173	576	3.47 (0.16)	231	768	3.47 (0.17)	231	768
	20	8.10 (0.32)	99	329	5.79 (0.31)	139	461	4.63 (0.32)	173	576
	30	10.41 (0.60)	77	256	6.94 (0.35)	116	384	6.94 (0.41)	116	384
	37	12.73 (0.63)	63	209	8.10 (0.51)	99	329	9.26 (0.41)	87	288
	45	16.20 (0.78)	50	164	10.42 (0.81)	77	256	10.42 (0.71)	77	256
E 30-P	4	5.79 (0.29)	139	461	4.63 (1.65)	173	576	3.47 (0.17)	231	768
	20	9.26 (0.45)	87	288	6.94 (0.37)	116	384	5.79 (0.27)	139	461
	30	12.73 (0.52)	63	209	9.26 (0.45)	87	288	8.10 (0.42)	99	329
	37	15.04 (0.60)	53	177	10.42 (0.52)	77	256	10.42 (0.48)	77	256
	45	20.83 (1.05)	39	128	12.73 (0.71)	63	209	12.73 (0.57)	63	209
E 100	4	3.47 (0.08)	231	768	4.63 (1.71)	173	576	3.47 (0.21)	231	768
	20	8.10 (0.16)	99	329	8.10 (0.42)	99	329	6.94 (0.41)	116	384
	30	10.41 (0.30)	77	256	11.57 (0.71)	69	230	12.70 (0.51)	63	209
	37	13.88 (0.42)	58	192	13.89 (0.82)	58	192	15.05 (0.71)	53	177
	45	19.67 (0.60)	41	135	17.36 (0.92)	46	154	19.67 (0.89)	41	135
E 100-P	4	5.78 (0.15)	139	461	5.78 (0.38)	139	461	3.47 (0.22)	231	768
	20	10.41 (0.31)	77	256	9.26 (0.47)	87	288	8.10 (0.37)	99	329
	30	17.36 (0.46)	46	154	13.89 (0.78)	58	192	13.88 (0.81)	58	192
	37	23.14 (0.45)	35	115	18.52 (0.95)	43	144	17.36 (0.87)	46	154
	45	31.25 (0.63)	26	85	23.15 (1.12)	35	115	23.14 (1.01)	35	115

Table 8. Some kinetic parameters for the colour density, colour intensity and Browning index degradation during storage following Arrhenius models, Ball models and Eyring model: numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions and values with similar letters are not significantly different (Tukey, $P > 0.05$).

	Colour density ¹			Colour intensity			Browning index		
	Ea (kJ.mol ⁻¹)	z (°C)	ΔH^* (kJ.mol ⁻¹)	Ea (kJ.mol ⁻¹)	z (°C)	ΔH^* (kJ.mol ⁻¹)	Ea (kJ.mol ⁻¹)	z (°C)	ΔH^* (kJ.mol ⁻¹)
E 30	18.89 a (0.57)	91 a (4)	16.44 a (1.01)	22.03 a (1.02)	77 a (3)	19.57 a (1.47)	20.89 a (1.03)	83 a (8)	18.49 a (1.84)
E 30-P	18.05 a (0.63)	100 a (9)	15.59 a (0.85)	22.34 a (0.95)	77 a (3)	19.87 a (1.42)	23.54 a (1.82)	71 a (6)	21.08 a (2.14)
E 100	23.76 b (1.12)	71 b (4)	21.29 b (0.81)	29.99 b (1.41)	59 b (2)	27.53 b (1.78)	31.79 b (1.32)	55 b (4)	29.32 b (1.74)
E 100-P	25.34 b (2.01)	67 b (4)	22.87 b (0.74)	30.63 b (1.48)	55 b (1)	28.17 b (1.69)	34.30 b (1.25)	50 b (5)	31.84 b (1.74)

Table 9. Experimental and calculated colour degradation following Arrhenius model as compared to different isothermal treatment during storage with roselle extract E 30: numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions

	Storage conditions		Variations (%)	
	T (°C)	t (days)	Experimental	Arrhenius
Colour density	10	90	34.9 (2.8)	34.4
	10	180	55.9 (4.9)	56.9
	25	60	32.1 (3.1)	33.8
	25	120	57.5 (4.1)	56.2
	40	30	25.7 (3.3)	25.4
	40	150	75.1 (7.0)	76.9
	45	30	22.5 (2.5)	23.1
	45	180	78.3 (6.5)	79.4
Browning index	10	90	25.3 (2.0)	26.3
	10	180	47.2 (3.4)	45.7
	25	60	28.6 (2.2)	27.3
	25	120	49.1 (4.8)	47.1
	40	30	21.8 (2.8)	21.2
	40	150	68.1 (5.8)	69.6
	45	30	24.6 (2.4)	23.7
	45	180	81.3 (7.1)	80.3
Colour intensity	10	90	34.3 (3.0)	35.0
	10	180	59.5 (4.1)	58.8
	25	60	40.2 (4.8)	37.7
	25	120	60.4 (5.5)	61.2
	40	30	29.4 (3.1)	30.4
	40	150	84.1 (7.3)	83.7
	45	30	30.3 (2.8)	31.9
	45	180	91.2 (7.7)	91.7

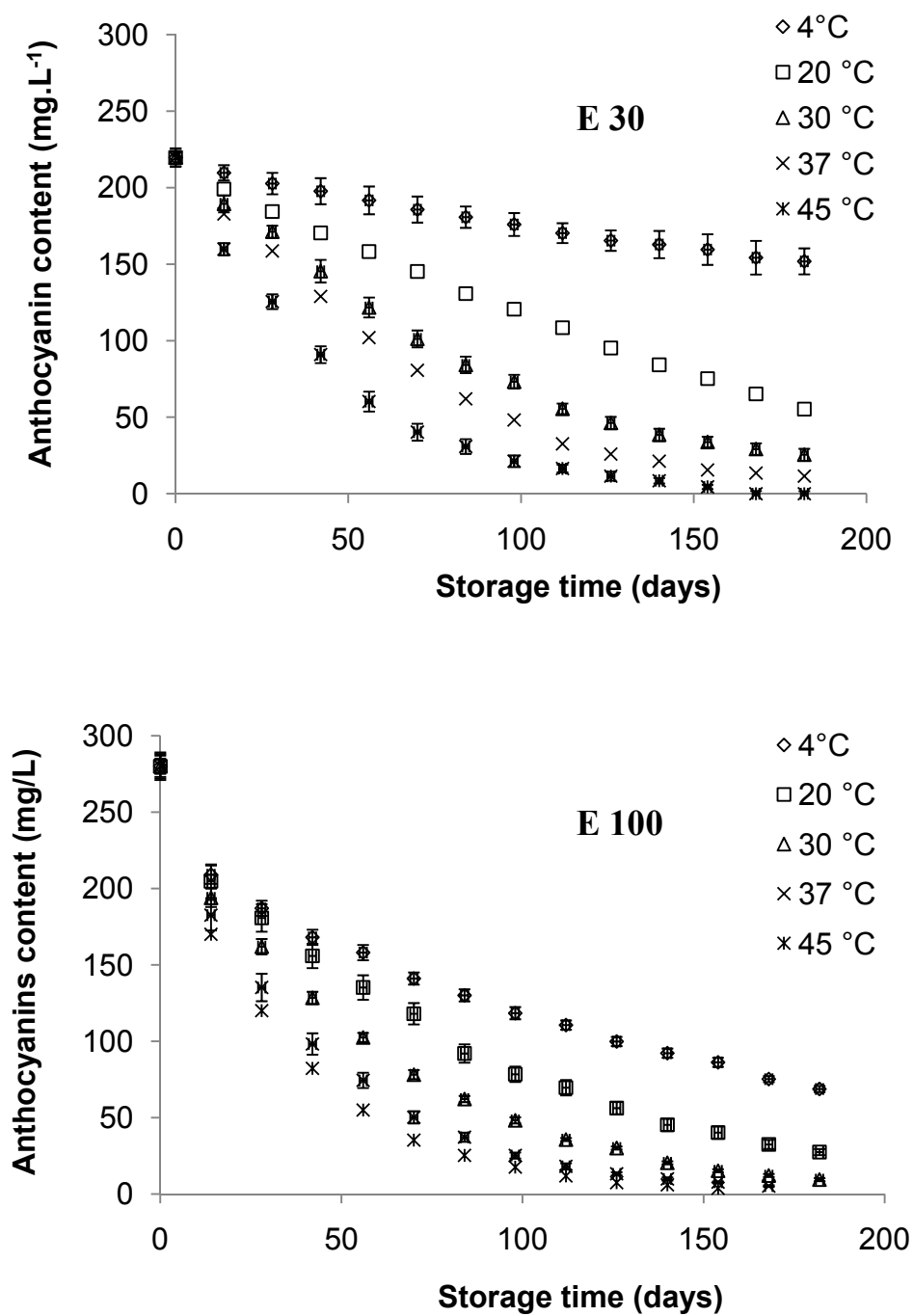
FIGURES


Figure 1. Degradation of anthocyanins in roselle extract (E 30, E 100) during storage at 4 to 45 °C (error bars represent standard deviation for n=3).

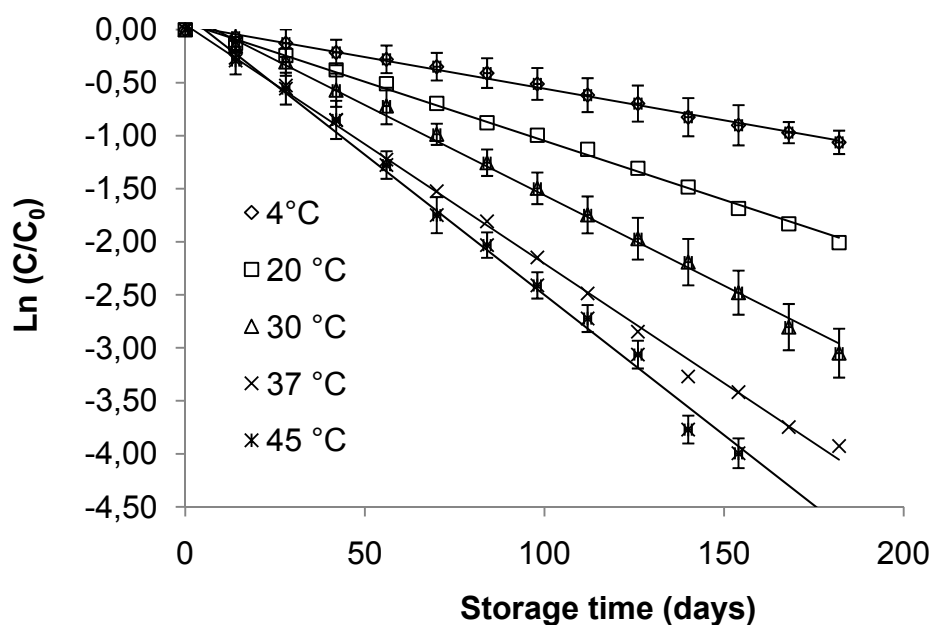


Figure 2. Example of thermal degradation kinetics of anthocyanins vs temperature in roselle extract E 30-P (extraction at 30 ° C, 3 h and pasteurization at 90 ° C for 5 min) (error bars represent standard deviation for n=3).

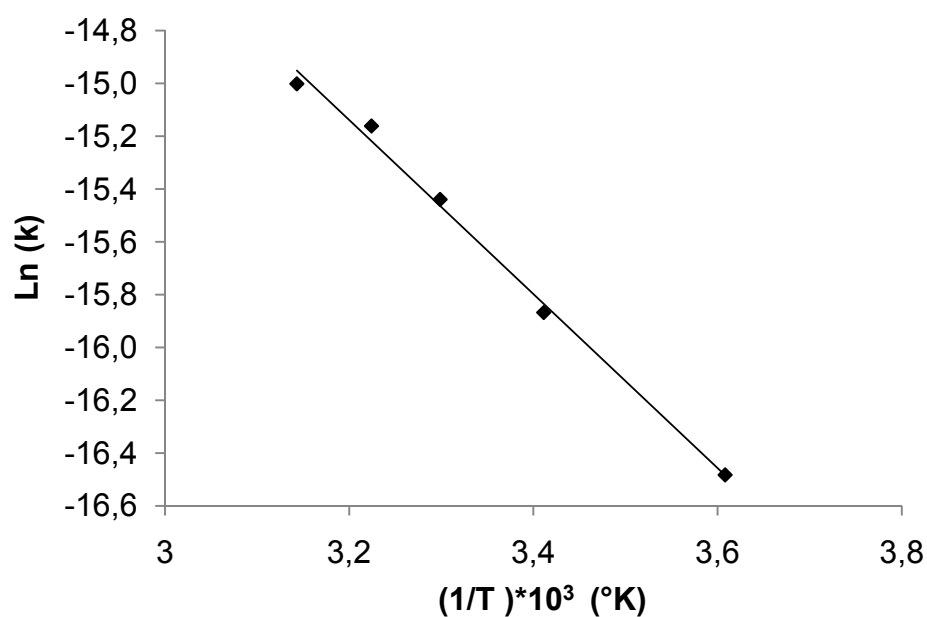


Figure 3. Rate constant (k) for anthocyanins of roselle extract E 30-P as a function of temperature (Arrhenius plot)

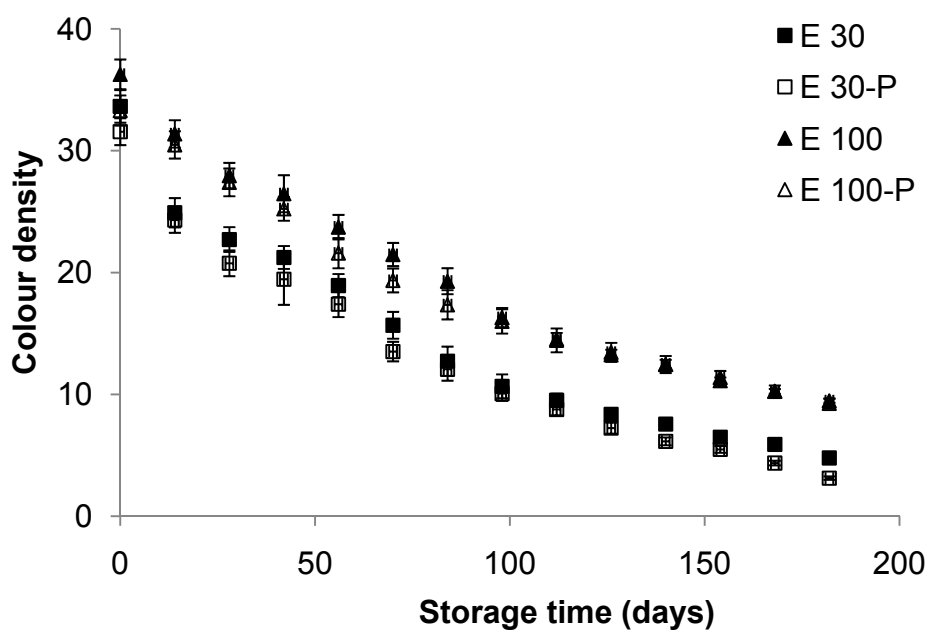


Figure 4. Changes of colour density for roselle extracts during storage at 45 °C (error bars represent standard deviation for n=3).

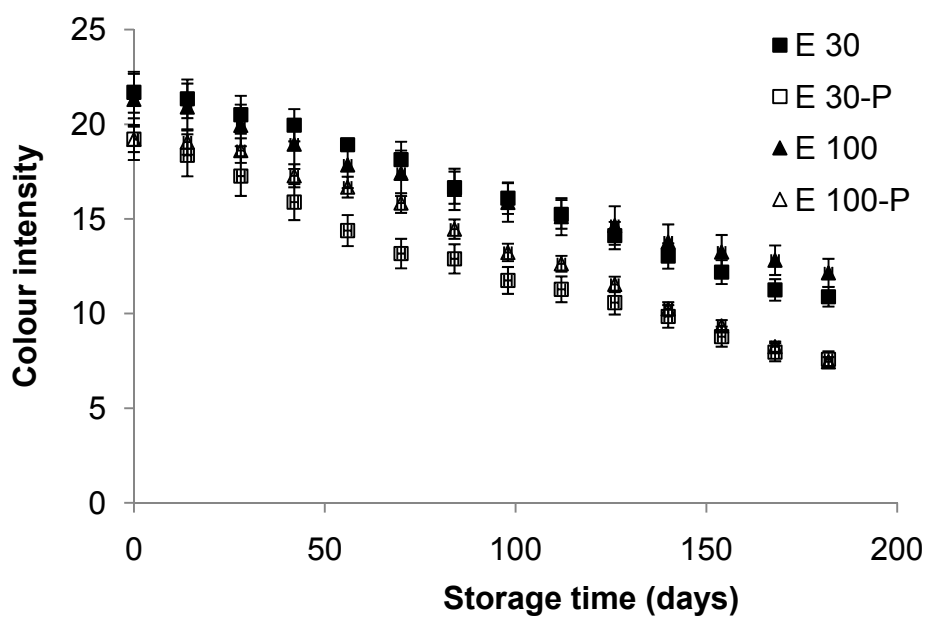


Figure 5. Changes of colour intensity for roselle extracts during storage at 4 °C (error bars represent standard deviation for n=3).

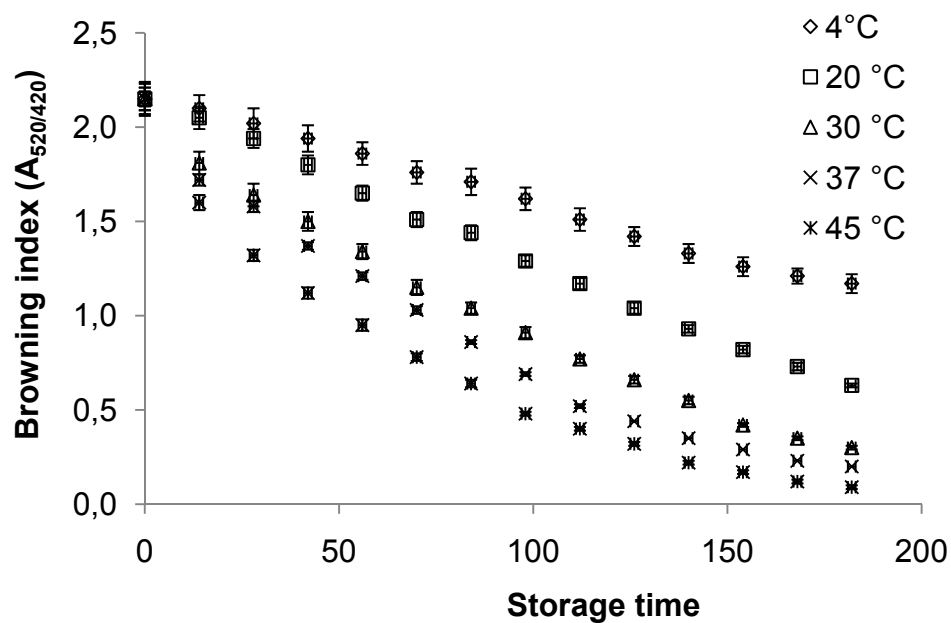


Figure 6. Browning index or total pigment decrease for roselle extract E 100 during storage at temperature from 4 to 45 °C (error bars represent standard deviation for n=3).

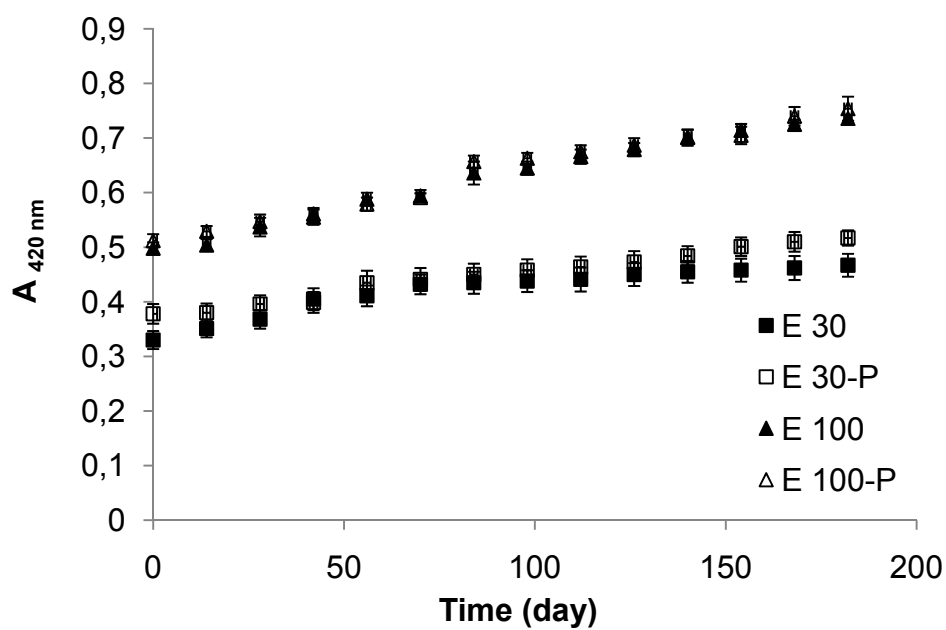


Figure 7. Color development at $A_{420\text{ nm}}$ with time in different roselle extract at 30 °C (error bars represent standard deviation for n=3).

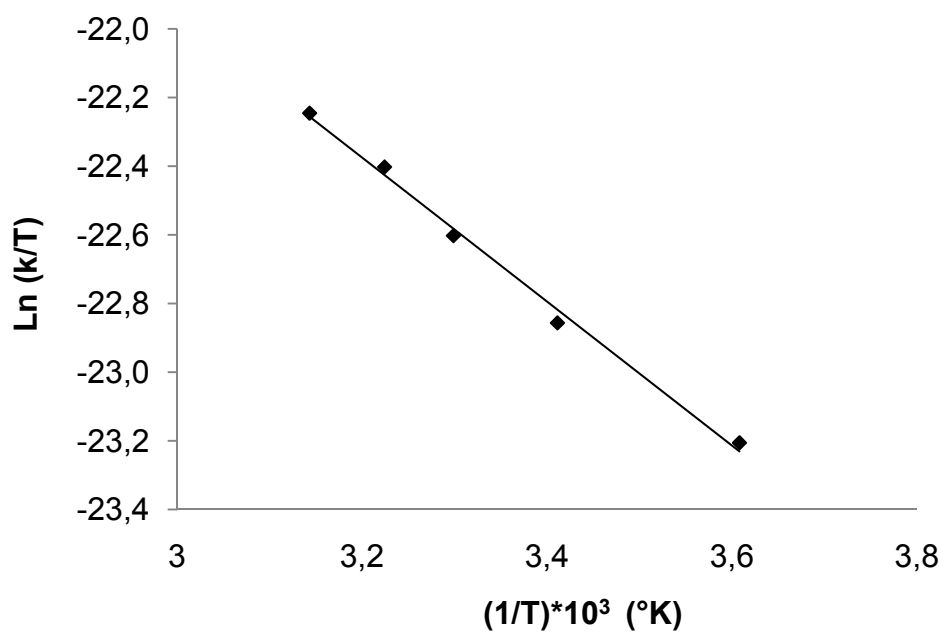


Figure 8. Rate constant (k) for colour density of roselle extract E 100 (extraction at 100°C during 30 min) as a function of temperature (Eyring plot)

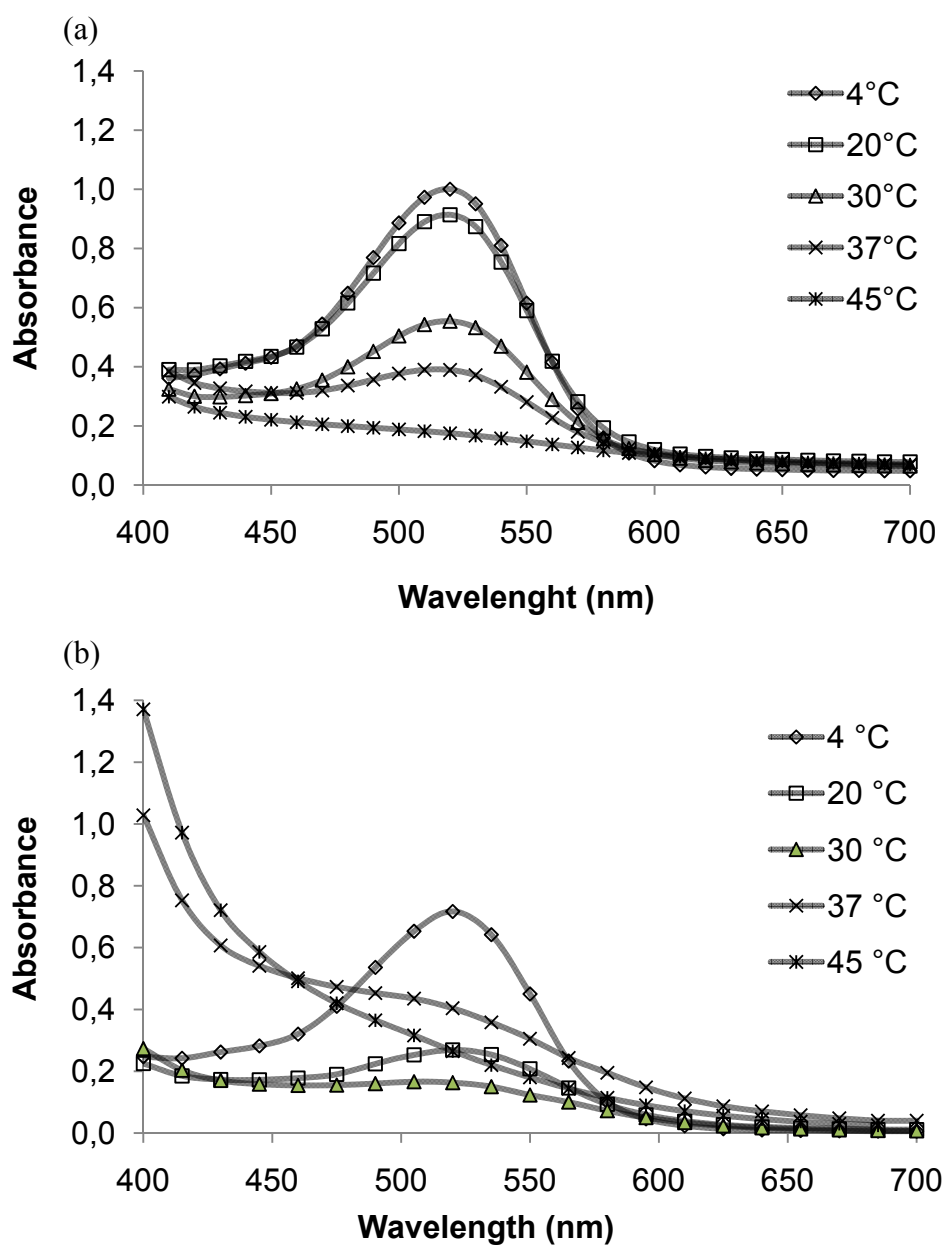


Figure 9. Typical visible spectra of the degradation of anthocyanin of the roselle extract E 30 during storage at 4 to 45 °C (a) storage time of 90 days and (b) storage time of 182 days.

2- Optimisation de l'extraction aqueuse des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa*

L'objectif de ce travail présenté dans la publication n°5 est d'étudier l'effet de la température, de la taille des particules, du temps de contact et du ratio massique calices/eau sur l'extraction aqueuse des anthocyanes à partir de calices secs d'*Hibiscus sabdariffa*. Dans une première partie, l'influence de toutes ces variables sur l'efficacité du processus d'extraction va être évaluée. Puis, en développant un modèle associant l'extraction solide-liquide et la dégradation thermique des anthocyanes, nous chercherons à optimiser les différents paramètres pour obtenir un extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa* caractérisé à la fois par un rendement d'extraction élevé et une concentration en anthocyane maximale.

L'étude des cinétiques d'extraction à plusieurs ratios calices/eau allant de 1/5 à 1/30, montre que le rendement d'extraction des anthocyanes dans l'eau est proportionnel à la masse initiale de calices. L'effet principal du ratio calice/eau est de modifier les constantes de solubilité et d'équilibre et ainsi d'augmenter les rendements d'extraction en anthocyanes jusqu'à un maximum correspondant au ratio calices/eau le plus faible. Ainsi à partir de calices entiers, le rendement maximal atteint au bout de 5 h d'extraction est de 48 % pour le ratio 1/30. La réduction de la taille des calices par broyage jusqu'à un diamètre moyen de 150 μm , augmente les rendements d'extraction de 65 à 125 % selon le ratio calices/eau. Ce fractionnement permet également de réduire la durée d'extraction à moins de 10 min. L'augmentation de la température d'extraction de 25 à 90 °C réduit également la durée d'extraction en augmentant le coefficient de diffusion des anthocyanes mais n'affecte pas le rendement d'extraction ni la concentration en anthocyanes.

Le modèle mis en place associant l'extraction solide-liquide et le coefficient de diffusion efficace, la taille des particules, la température, le ratio calices/eau et la dégradation thermique des anthocyanes a été validé. Les données expérimentales pour le rendement d'extraction et la concentration en anthocyane sont très proches de celles déterminées à partir du modèle. L'exploitation du modèle confirme que la température n'a pas d'effet significatif sur le rendement, contrairement au ratio calices/eau et à la taille des calices. A partir d'un ratio calice/eau de 1/5, un rendement d'extraction de 63 % et une concentration en anthocyanes de 0,3 g.L^{-1} peuvent être obtenus en moins de 10 min d'extraction à une température de 25 °C.

Selon l'objectif de production, la nature du produit final recherché et les opérations ultérieures, un compromis doit être trouvé entre le rendement d'extraction et la teneur en anthocyanes. Le modèle, mis en place peut être valablement utilisé pour les études d'optimisation dans le cas d'une production industrielle.

Publication n° 5

**Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*:
experimental kinetics and modeling**

Soumis au journal of Food Engineering

**AQUEOUS EXTRACTION OF ANTHOCYANINS FROM *HIBISCUS SABDARIFFA*:
EXPERIMENTAL KINETICS AND MODELING**

**Mady CISSE ¹, Philippe BOHUON ², Cheikhou KANE ¹, Mama SAKHO ¹, Oumar SOCK ¹,
Manuel DORNIER* ²**

¹Ecole Supérieure Polytechnique, Université Cheikh Anta Diop, B.P. 5085, Dakar Fann, Sénégal,

²UMR QUALISUD, CIRAD, Montpellier SupAgro, 73 rue J.F. Breton, TA B-95/16, F-34398 Montpellier cedex 5, France,

ABSTRACT

Aqueous extraction from *Hibiscus sabdariffa* calyx is involved worldwide for the production of many products and particularly for tea and beverages. It is known to be a good source of anthocyanin. Solid-liquid extraction was performed from *Hibiscus sabdariffa* calyx with water at temperatures ranging from 25 °C to 90 °C in order to obtain anthocyanin extracts. Batch experiments were done to study the influence of the operating parameters such as solid-to-solvent ratio and particle size that was found to have the main impact on anthocyanin extraction efficiency. Maximum yield of anthocyanins (88 %) was obtained at 25 °C with the highest solid-to-solvent ratio (1/25). The decrease in the particle size of *Hibiscus sabdariffa* calyx from 750 µm to 150 µm reduced the extraction time from 160 min to 8 min. The increase of extraction temperature enhanced the solubility of anthocyanin that reduced the extraction time by increasing the diffusion coefficient which ranged from $3.9 \cdot 10^{-11}$ to $1.35 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ between 25 °C to 90 °C. An extraction model which included the particle size, solid-to-solvent ratio, temperature and anthocyanin degradation kinetic was proposed. A good agreement between the models predicted results and experimental data was demonstrated. No impact on the anthocyanin extraction yield was observed with increasing temperature which is reflected elsewhere in the loss of anthocyanin at extraction temperatures above at 50 °C. So, a strategy to maximize the extraction yield for a short time with the highest anthocyanin concentration for *Hibiscus sabdariffa* extract can be developed. From a solid-to-solvent ratio of 1/5, an extraction yield of 63 % and anthocyanin concentration of $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ can be obtained in less than 10 min.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, anthocyanin, solid-liquid extraction, diffusion and degradation model

Nomenclature

C_L	concentration of anthocyanin in the extract (g.L^{-1})
C_S	concentration of anthocyanin in the calyx of <i>Hibiscus sabdariffa</i> (mg.g^{-1})
D_{eff}	anthocyanin effective diffusivity ($\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
E_a	activation energy (J.mol^{-1})
$J(t)$	the incoming flux of anthocyanin in the liquid ($\text{kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
k	rate constant (s^{-1})
k_{ref}	the pre-exponential factor (s^{-1})
M_i	molecular weight of delphinidin sambubioside (g.mol^{-1})
m_L	masse of extract (kg)
m_S	masse of calyx of <i>Hibiscus sabdariffa</i> (kg)
$m_{a/L}$	masse of anthocyanin in the extract (kg)
$m_{a/S}$	masse of anthocyanin in the calyx of <i>Hibiscus sabdariffa</i> (kg)
R	universal gas constant ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
R_a	extraction yield of anthocyanin (%)
T	temperature ($^{\circ}\text{C}$, K)
V_L	solvent volume (m^3)

Greek letters

μ	viscosity of extraction solvent (Pa s)
-------	--

INTRODUCTION

The anthocyanins represent the largest group of water soluble pigments in the plant. They are highly appreciated in the food industry for their coloring properties, which can give food various hues of red and violet. Many edible plants are sources of anthocyanins (172-175). These include roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa*) (176-178).

Roselle calyx contains high amounts of anthocyanins that can be as high as 2.5 g/100 g DW (184, 205). The calyx contains two main anthocyanins: delphinidin-3-sambubioside or delphinidin-3-xylosylglucoside or hibiscin and cyanidin-3-sambubioside or cyanidin-3-xylosylglucoside or gossypicyanin, and two minor anthocyanins, delphinidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside. So, aqueous extract from calyx of *Hibiscus sabdariffa* presents several interests. It's used worldwide in the production of drinks and is a source of natural food colorants. In fact, extraction and purification of bioactive compounds such as anthocyanins from natural sources have become very important for the use of phytochemicals in the preparation of food supplements or nutraceuticals, functional food ingredients and food additives, and pharmaceutical and cosmetic products.

Solid-liquid extraction of anthocyanins is commonly carried out considering several parameters such as temperature, pH, solvent, etc. Methanol and ethanol containing a small amount of acid are the most commonly used solvents (29, 206, 207). Hot water is also used

(26, 208). Effects of pH of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments have also been studied (23). Effects of temperature on the anthocyanins degradation and stability are also carried out (184). These studies showed that acid may cause partial hydrolysis of the acyl moieties in acylated anthocyanins, especially in anthocyanins acylated with dicarboxylic acids such as malonic acid. The extraction kinetics involves multiple steps. However, the main part of the operation is limited by diffusion because the natural structure of plants opposes a resistance to any penetration by a liquid; thus the process is very slow. As seen in the literature (23, 26, 209-211), the rate of mass transfer during solid-liquid extraction might be increased by reducing the particle size, increasing the effective diffusion coefficient due to the increase in extraction medium temperature, or change in the pH medium, in the structure of material. Moreover, from an economic view, it is advantageous to reduce the extraction time knowing the diffusion coefficient.

Therefore, in this work, the aim is to study the effect of temperature, particle size, contact time, and solvent-to-solid ratio on the aqueous anthocyanins extraction from *Hibiscus sabdariffa* calyx. First, the influence of all these variables on the efficiency of the batch extraction process will be evaluated. Then, using the solid-liquid extraction modeling is discussed to optimize the various parameters to obtain a roselle extract with both a high extraction yield and concentration of anthocyanin. The results may be used for the further optimization studies to design a industrial and commercial production.

2- Equipement and methods

2-1- Batch extraction

To prepare the different solid-to-solvent ratio ,dried calyxes from Senegal Thai variety were mixed with demineralized water. Temperature values ranged from 25°C to 90 °C, extraction time from 10 min to 10 hours and solid-to-solvent ratio in kg.kg⁻¹ varied between 1:5 to 1:25. Calyx were either used whole or crushed manually to a average particle size of 150 ± 10 µm. Amber bottles of 250 ml were used as batch extractor and were maintained in a thermostatic water bath without agitation (Memmert, Schwabach, Germany) adjusted to the extraction temperature. A Heidolph EKT 3001 digital temperature controller (± 1 °C), fitted to a filed sealed bottle, was used as a control to measure the product temperature during experiments. At specific time intervals, the bottles were taken from the batch extractor, immediately cooled by submersion in an ice bath and filtered with a 0.45 µm filter before analysis. All trials and measurements were done three-fold

2-2- Quantification of total monomeric anthocyanins

The total anthocyanin content was assessed by the pH differential method (162). All absorbance readings were done against distilled water, which acted as control. Spectrophotometric measurements were carried out using Shimadzu spectrophotometers (UV-1605, Kyoto, Japan). Concentrations were expressed as delphinidin 3-xylosylglucoside equivalents for roselle (MW=577 g.mol⁻¹). The molar extinction coefficient at pH 1 and 510

nm, used for calculation, was $26000 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (184). All of the reagents used were of analytical grade and were purchased from Sigma (L'isle d'Abeau, France).

The extraction yield of anthocyanin (R_a) has been considered the main factor to monitor and compare the different kinetics of extraction. It was determined from Equation 1.

$$R_a = \frac{m_{a/L}}{m_{a/S}} \quad (1)$$

where $m_{a/L}$ and $m_{a/S}$ represent respectively the masses of anthocyanin in the extract and in the calyx of *Hibiscus sabdariffa* determined from equations 2 and 3.

$$m_{a/L} = C_L \cdot m_L \quad (2)$$

$$m_{a/S} = C_S \cdot m_S \quad (3)$$

where C_L and C_S respectively represent the concentrations of anthocyanin in the extract and in the calyx of *Hibiscus sabdariffa* determined using the pH-differential method. And m_L and m_S corresponding to the masses of extract and calyx.

2-3- Mass transfer model

2-3-1-Model assumptions

In order to describe the anthocyanin transfer, the following hypotheses were used:

- A1) The solid particle was a sphere shape initially with a uniform anthocyanin concentration C_S
- A2) The anthocyanin concentration inside solid ($C_S(r, t)$) depended only on position (r) and time (t).
- A3) The solvent in the batch reactor was perfectly mixed. The transfer resistance between solid/liquid phases was negligible and so the anthocyanin concentration in the solvent ($C_L(t)$) depended only on time.
- A4) Anthocyanin concentration on the liquid just adjacent to the solid was equal to anthocyanin concentration in the solid at the interface.
- A5) The cumulative effect of time-temperature history on anthocyanin degradation was described in terms of irreversible first-order kinetic.
- A6) Anthocyanin transport was described by diffusion phenomenon and characterized by an anthocyanin effective diffusivity (D_{eff}) independent on C_S .

2-3-2- General equations

According to the basic assumptions of the model, the diffusion model of solid-liquid extraction was used where the simultaneous effect of temperature on anthocyanin degradation kinetic was included. The resulting set of partial differential equation is the mass balance equation for the particle:

$$\frac{\partial C_S(t,r)}{\partial t} + D_{eff} \Delta C_S(t,r) = -k C_S(t,r) \quad (4)$$

where k is the rate constant (s^{-1}) which varied with the system's absolute temperature, T (K) according to Arrhenius law as follows:

$$k = k_{ref} \exp \left[\frac{-E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (5)$$

where k_{ref} , E_a and R were respectively the rate constant (s^{-1}) at reference temperature (T_{ref}), the apparent activation energy ($J.mol^{-1}$), and the gas constant ($8.312 J.mol^{-1}.K^{-1}$).

The mass balance equation for the solvent is:

$$V_L \frac{dC(t)}{dt} = J(t) - k C_L(t) \quad (6)$$

where V is the solvent volume and $J(t)$ is the incoming flux of anthocyanin in the liquid. $J(t)$ was equal to the outcoming flux of anthocyanin of the particle which constituted boundary conditions of equation (4).

2-3-3-Initial and boundary conditions

Initial conditions

For the solid phase at $t = 0$

$$C_S(0, r) = C_S^0 \quad 0 \leq \forall r \leq \frac{e}{2} \quad (7)$$

For the solvent

$$C_L(0) = 0 \quad (8)$$

Boundary conditions

At the center of solid ($r = 0$)

$$\left. \frac{\partial C_S(r,t)}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad \forall t \quad (9)$$

At the interface of the particle ($r = \frac{e}{2}$), the outcoming flux of anthocyanin was:

$$J(t) = -D_{eff} A \left. \frac{\partial C_{r,t}}{\partial r} \right|_{r=e/2} \quad (10)$$

where A is the particle area.

2-3-4- Input parameters

The anthocyanin effective diffusivity (D_{eff}) expressed in $m^2.s^{-1}$ was estimated with the mutual anthocyanin-water diffusivity with empirical correlation (167).

$$D_{eff} = \frac{9,96 \cdot 10^{-16}}{\mu M_i^{1/3}} T \quad (11)$$

where T ($^{\circ} K$) the extraction temperature M_i the molecular weight of extracted compound (in our case of delphinidin sambubioside, majority anthocyanin in calyx of *Hibiscus sabdariffa*) and μ (Pa s) viscosity of extraction solvent (water) to the extraction temperature.

The input parameters data were given in Table 1.

2-3-5- Numerical treatment

The system consists in two variables $C_s(r, t)$ and $C_L(t)$ respectively dependent on equations (4) and (6). The system was solved using the FEM-based commercial code Comsol MultiphysicsTM (version 3.1, Comsol Inc., Stockholm, Sweden) with the boundary conditions given by Eqs. (9) and (10). The particle meshing was created by ComsolTM (30 elements). Convergence of the numerical results was checked. Lagrange polynomials (2 order function) are the interpolation function. The linearized problem was solved at each time step by the UMFPACK method (unsymmetric multifrontal method and direct sparse LU factorization).

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction kinetics

The total monomeric anthocyanins extracted were plotted as a function of time for five solid-to-solvent ratio (Figure 1) using whole calyces of *Hibiscus sabdariffa*. For all the ratio, the plot shows that the anthocyanins yield rises asymptotically approaching a limiting equilibrium concentration (Y_{∞}). The shape of these curves closely resembles those already published for similar extraction (206, 211). The anthocyanin extraction yield in the extracted solvent is almost proportional to the initial solid mass. The anthocyanins yields should have been affected by the extraction conditions, by modifications on solubility and solute-solvent interactions that could modify the activity coefficients and thus the solubility of the compounds. The main effect of the solid-to-solvent ratio was to modify the solubility and equilibrium constants and thus increase the anthocyanin extraction yields to a maximum at the highest solid-to-solvent ratio. Increasing the solid-to-solvent ratio increased the anthocyanin yield in the extraction. Similar results was obtained during extraction of phenolic compounds from milled berries (28), with semi-batch extraction of anthocyanin from red grape pomace (206) and during solid-liquid extraction of andrographolide from plants (212). However we noted that the extraction yields are more than 48% lower for the solid-to-solvent ratio of 1/30. After 5 hours of extraction, the extraction yields were not significantly different for the ratios

1/15 to 1/30. After 5 hours of extraction at 25 °C, the equilibrium concentration (Y_{∞}) is not reached. To increase the extraction efficiencies while reducing extraction times, the roselle calyxes were ground manually to an average diameter of 150 μm .

Figure 2 shows the evolution of extraction yield. The curves show that the rate of extraction sharply increased with the decrease of the size of calyx. This increase varies from 65 to 125 % depending on the ratio. It's a classical result since the pore diffusion path increases with the particle size. Moreover, the reduction of particle size has the effect of generating a larger contact area and thus exchange area between the anthocyanins and the solvent was higher. Concentration seems to be reaching equilibrium in the early minutes of the extraction. It appears then that the extraction of anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* is achieved mainly during the first 10 minutes regardless of the solid-to-solvent ratio. Mantel and al.(206) also showed lower extraction time from 30 to 60 min during semi-batch extraction from red grape pomace. Extraction times above 2 h only permit an increase of anthocyanin extraction yield of 1 to 3 %. For all solid-to-solvent ratio, the values of Y_{∞} increased with the amount of solvent involved in the extraction and when the particle size decreases. The increase of anthocyanins yields with the increase of the solid-to-solvent ratio is consistent with mass transfer principles. Indeed, driving force during mass transfer within the solid is considered to be the concentration gradient, which was greater when a higher solid-to-solvent ratio was used, resulting in an increase in the diffusion rate.

For a better understanding of the impact of particle size and solid-to-solvent ratio in terms of the overall diffusion as the limiting process of the extraction kinetics, we carried out the D_{eff} . The value of D_{eff} was then injected into a model of solid-liquid extraction in which the resolution was made using the Comsol software.

Extraction model

The D_{eff} value at 25 °C was estimated to $3.9.10^{-11} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$. It was in agreement with those found in previous studies. Indeed, using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction, Ben Amor and Alaf (211) values of D_{eff} between $4.62.10^{-11}$ to $6.12.10^{-11} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ were obtained. According several authors (167, 213) the diffusion coefficient can be written as a function of temperature and viscosity. So the diffusion coefficient will increase with the temperature. So increasing the extraction temperature from 25 °C to 90 °C increases the diffusion coefficient from $3.9.10^{-11}$ to $1.4.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$. For a given solid-to-solvent ratio, the increase in temperature has no influence on the yield and concentration of anthocyanin but decreases the extraction time.

Figure 3 illustrates the good match obtained between experimental data and predicted values of anthocyanins yield calculated by the model. Therefore, the model developed and which included the particle size, solid-to-solvent ratio, temperature and anthocyanin degradation kinetic was validated. Moreover, it was noted that increasing the temperature beyond certain values led to a decrease in anthocyanin yields due to the high sensibility of anthocyanins. Indeed, in previous works the thermal degradation kinetics of anthocyanins from roselle

extract was carried out using Arrhenius, Eyring and Ball models (184). Using the model, we plotted the evolution of the extraction yield for the solid-to-solvent ratio 1/5 (**Figure 4**). A good match was also observed between experimental data and predicted values of anthocyanins yield calculated. This result first demonstrates the strength of our model and secondly, confirms the previously obtained results on the thermal degradation of roselle anthocyanins (184).

Modeling the solid-liquid extraction by integrating the thermal degradation of anthocyanins gives results very close to experimental data. In what follows, the objective will be to develop a strategy to maximize the extraction yield for a short time with the highest anthocyanin concentration for *Hibiscus sabdariffa* extracts

Optimum conditions

Using the model, the extraction yields were determined according to the particle size of *Hibiscus sabdariffa* (**Figure 5**). By reducing the particle size, the extraction time is dramatically reduced to achieve the same anthocyanin extraction yield. The extraction will be more rapid as the particle size is low. However, it is important to consider the removal of other undesirable compounds such as pectin, but also subsequent operations such as filtration. The main effect of the solid-to-solvent ratio was to increase anthocyanin yield to a maximum at the highest solid-to-solvent ratio. However, to reduce energy costs and duration of subsequent operations such as concentration, filtration of the anthocyanin extract, it is essential to limit the amount of solvent to use. Increasing temperature favored extraction by enhancing solubility of anthocyanins and increasing the diffusion coefficient, which increased the extraction rate and reduced the extraction time. But the problem with raising the temperature is that all reactions are accelerated, including all the unwanted side reactions such as anthocyanin and nutritional degradation, the nonenzymatic browning reactions and a decrease in the stability of anthocyanins during storage (163, 184, 186).

Figure 6 shows the response plots for the anthocyanin yield and concentration as a function of solid-to-solvent ratios ranging from 1/1 to 1/10. The data presented correspond to the maximum values. Analysis of these curve shows several results. As expected the solid-to-solvent ratio has a positive effect on the anthocyanin yield but a negative effect on the anthocyanin content. Similar results about the effect of temperature and solid-to-solvent ratio on the extraction of anthocyanins compounds were also reported for grape pomace by Pinelo and al. (29), for milled berries by (28), for the extraction of andrographolide from plants (212). All these authors also found a linear link between temperature and solid-to-solvent ratio with anthocyanin extraction yield.

CONCLUSION

In conclusion, Roselle calyx is a good source of anthocyanin with several potential applications in the food, pharmaceutical and cosmetic industries as far as anthocyanin extract is concerned. The search for optimal operating conditions to maximize the efficiency of the

process is necessary for industrial application. So, in this study, it has been found that the solid-to-solvent ratio and the particle size have a strong effect on both velocity and anthocyanin extraction yield. The main effect of the solid-to-solvent ratio was to increase the anthocyanin yield and decrease the anthocyanin content. Higher temperature favored extraction by increasing diffusion coefficient on anthocyanins. This enhancement of the mass transfer process resulted in lower extraction time and has no positive influence on the anthocyanin extraction yield and anthocyanin content for a given solid-to-solvent ratio. The experimental data for extraction yield and concentration content were very close to those determined from the model that coupling the solid-liquid extraction and the thermal degradation of anthocyanins. Depending on the purpose of production, products to manufacture and subsequent operations, a compromise must be found between the anthocyanin extraction yield and the anthocyanin content. For this model, a set up can be used validly for further optimization studies to design a industrial and commercial production.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Ministry of Foreign Affairs of France, the SCAC of Embassy of France in Senegal and CIRAD for its financial support

TABLEAU ET FIGURES
Table 1. Input parameters used for computations

Input parameters	Value	Reference
Effective diffusivity (D_{eff}) ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	4×10^{-11}	[20]
Anthocyanin concentration in solid at $t = 0$ (C_S^0) (g.L^{-1})	1.5	[19]
Anthocyanin concentration in solvent at $t = 0$ (C_L^0) (g.L^{-1})	0	
Activation energy (E_a) (J.mol^{-1})	61 600	[9]
Rate constant (k) (s^{-1})	44 200	[9]
Universal gas constant (R) ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).	8.312	our data
Extraction temperature (T) ($^{\circ}\text{C}$)	25–90	our data
Solid-to-solvent-ratio (kg.kg^{-1})	1:1 –1:25	our data

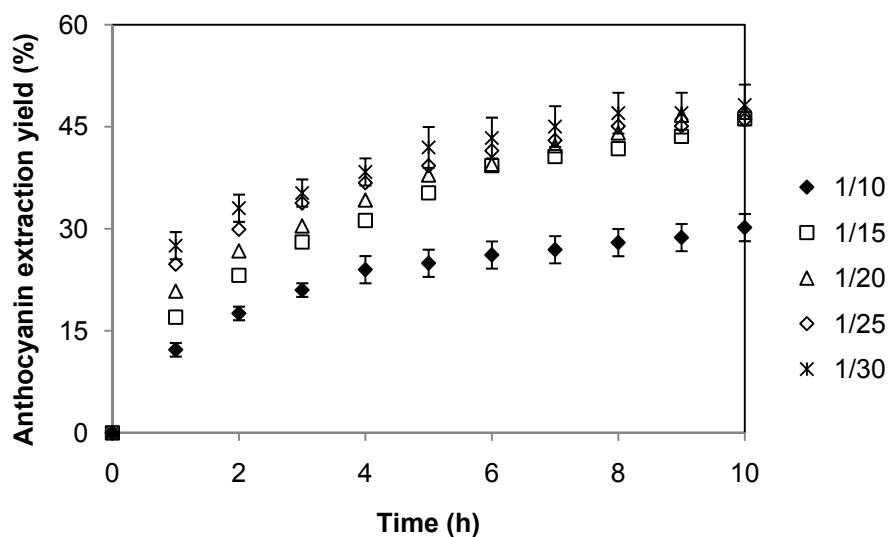


Figure 1. Anthocyanins extraction yield from whole calyx of *Hibiscus sabdariffa* as a function of time at 25°C for different solid-to-solvent ratio with particle size of 2 cm.

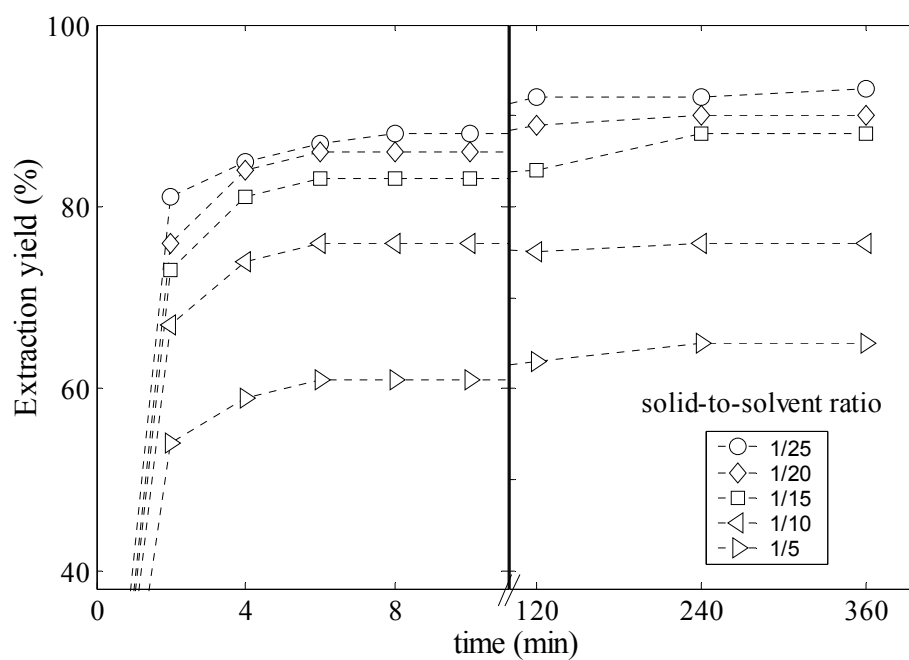


Figure 2. Anthocyanin extraction yield as a function of time, at 25°C for different solid-to-solvent ratio with particle size of 150 μm .

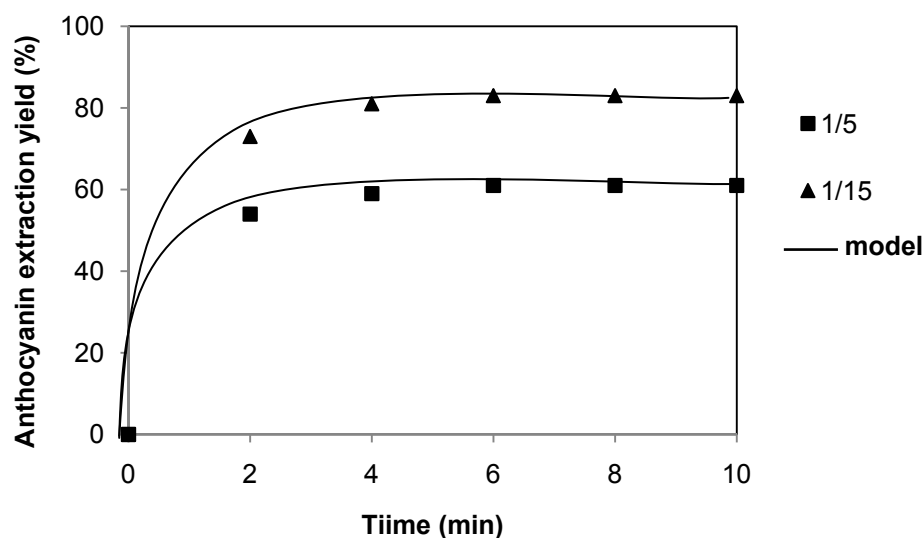


Figure 3. Comparison of the experimental and simulated extraction kinetics of total monomeric anthocyanins from calyx of *Hibiscus sabdariffa* at 25 °C with an average particle size of 150 μm with two solid-to-solvent ratio.

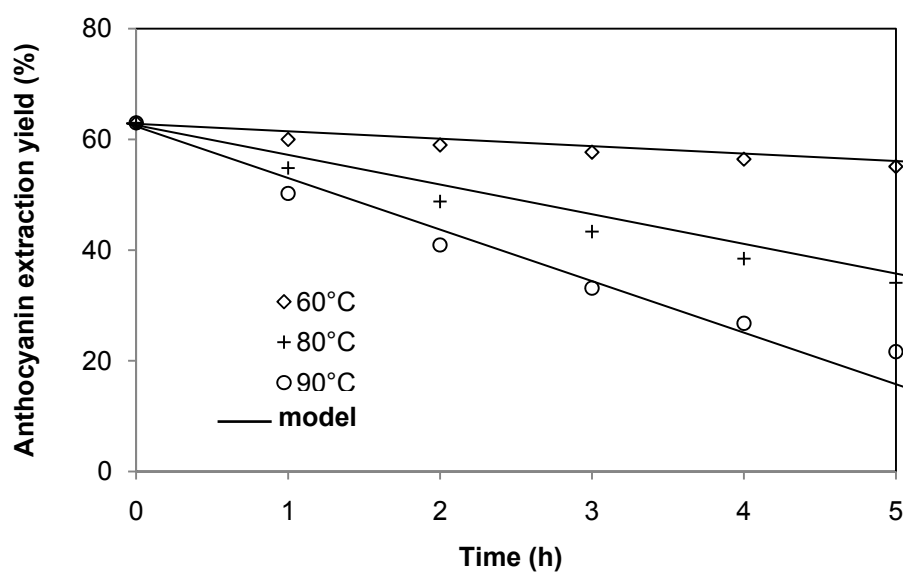


Figure 4. Impact of extraction temperature in the anthocyanin degradation with solid-to-solvent ratio 1/5 by using comparison experimental results and model values with particle size of 150 μm

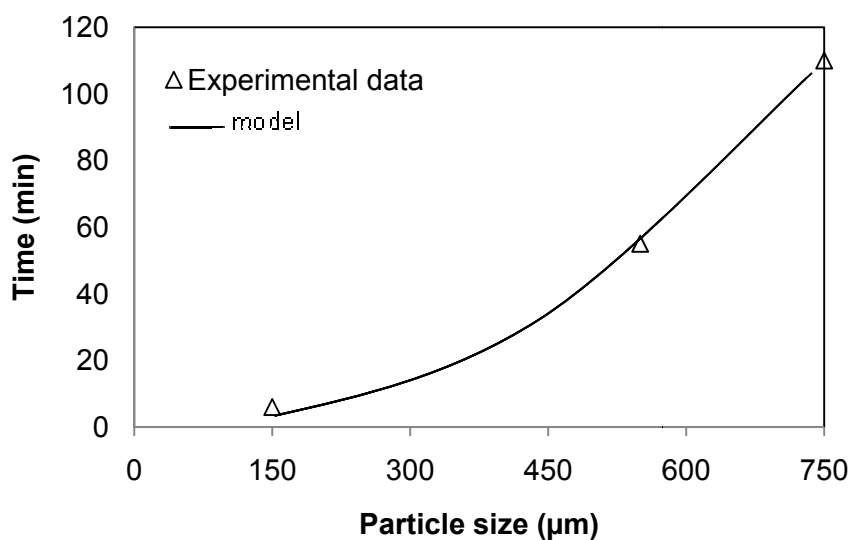


Figure 5. Influence of the particle size on the extraction time to reach an anthocyanin yield of 62 % during extraction at 25 °C with the solid-to-solvent ratio of 1/5.

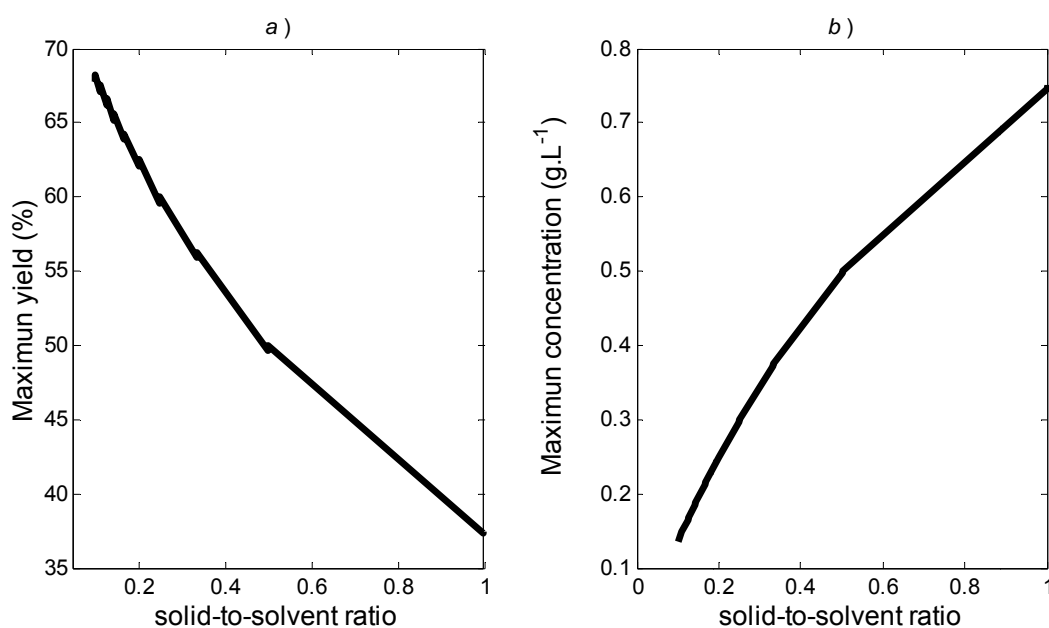


Figure 6. Simulated values of maximum extraction yields of anthocyanins (a) and maximum anthocyanins content (b) estimated with the model vs solid-to-solvent ratio at 25°C with particle size of 150 μm

3- Microfiltration de l'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa*

Les traitements thermiques appliqués à l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* engendrent des dégradations des anthocyanes, des paramètres de couleur des extraits (cf. Publication n°3). Des problèmes de stabilité sont également mis en évidence au cours du stockage (cf. Publication n°4). La microfiltration tangentielle, technique membranaire de stabilisation à froid, représente donc une alternative intéressante à la pasteurisation thermique classique. En effet, elle a déjà été appliquée avec succès à la stabilisation de jus thermosensibles.

Les travaux entrepris ont pour objectif d'étudier l'intérêt d'utiliser la microfiltration tangentielle pour stabiliser à froid l'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa* obtenu après optimisation de l'extraction solide-liquide (Publication n° 6).

Les essais réalisés sur un pilote de laboratoire à un facteur de réduction volumique (FRV) constant égal à 1 montre que l'augmentation de la pression transmembranaire se traduit par une augmentation significative des densités de flux de perméat. Celles-ci varient entre 136 et 193 L.h⁻¹.m⁻² pour des pressions transmembranaires comprises entre 1,2 à 3,7 bar. Malgré l'augmentation de la résistance hydraulique totale, une densité de flux de perméat de 185 L.h⁻¹.m⁻² à 2,5 bar peut être obtenu à FRV 1. L'étude de l'influence du FRV sur la densité de flux montre qu'un flux de perméat de 95 L.h⁻¹.m⁻² peut être obtenu à FRV 20, soit un rendement global de production de 95 %. Ce flux maximal est obtenu à une pression optimale de 3,7 bar significativement différent de la valeur optimisée à FRV 1. L'hypothèse usuelle consistant à considérer que les conditions opératoires optimales de la microfiltration tangentielle sont les mêmes à FRV = 1 et à FRV croissant n'est pas validée dans notre cas. Un modèle simple permettant de prévoir le flux de perméat en fonction du FRV a été mis en place puis validé sur un pilote semi-industriel. Les essais réalisés au cours d'un essai industriel destiné à la production d'extrait clarifié et stabilisé d'*Hibiscus sabdariffa*, ont montré une variation de 9 à 15 % entre les flux calculés avec le modèle et ceux obtenus expérimentalement. Après 90 j de conservation, aucun développement microbiologique n'a été noté dans les extraits conservés à des températures de 4, 20 et 37 °C. Cependant des pertes en anthocyanes et en vitamine C ont pu être observées. Des tests d'analyse sensorielle n'ont par contre montré aucune différence significative au seuil de 95 % entre les extraits conservés à 20 °C pendant 3 mois et un extrait fraîchement préparé.

La microfiltration tangentielle sur membrane céramique à FRV croissant peut donc être parfaitement envisagée pour produire un extrait d'*Hibiscus sabdariffa* stabilisé microbiologiquement sans avoir recours à un traitement thermique.

Publication n° 6

**Interest of crossflow microfiltration for the cold stabilization of roselle
(*Hibiscus sabdariffa* L.) extract**

Soumis au journal of Food Engineering

INTEREST OF CROSSFLOW MICROFILTRATION FOR THE COLD STABILIZATION OF ROSELLE (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.) EXTRACT

MADY CISSE¹, FABRICE VAILLANT^{2,3}, SORO DOUDJO⁴, MAX REYNES²,
MANUEL DORNIER^{2,*}

¹Ecole Supérieure Polytechnique, Université Cheikh Anta Diop, B.P. 5085, Dakar Fann, Sénégal

²UMR QUALISUD, CIRAD, Montpellier SupAgro, 73 rue J.F. Breton, TA B-95/16, F-34398 Montpellier cedex 5, France

³Centro de Investigación de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Código Postal 2060, San José, Costa Rica

⁴Laboratoire des procédés industriels, de synthèse et de l'Environnement (LAPISEN), Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny (INP-HB), BP 1313 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire.

* Author to whom correspondence should be addressed (phone +33/467614432; fax +33/467614433; e-mail dornier@cirad.fr).

ABSTRACT

Roselle drink is highly appreciated by consumers for the freshness conveyed, its red colour and acid taste. This extract is rich in vitamin C, organic acids and anthocyanins, which can be destroyed by heat treatment stabilization. In this study, roselle extract was cold sterilized by crossflow microfiltration using tubular ceramic 0.2 µm pore size membrane. At laboratory scale (pilot featured by membranes with an effective filtration area of 55 cm²), we compared the effect of transmembrane pressure at VRR 1 and at increasing VRR. We noticed that the optimal operating conditions at VRR 1 cannot be generalized when VRR is greater than 1. It is then necessary to do the optimization of transmembrane pressure at increasing VRR. Indeed, at VRR the optimal transmembrane pressure was 2.5 bar with a permeate flux of 185 L.h⁻¹.m⁻², while at VRR 20 optimal pressure was 3.7 bar with a permeate flux of 95 L.h⁻¹.m⁻². A simple model that allowed to represent the effect of VRR and transmembrane pressure on the permeate flux was adjusted with the experiments obtained at laboratory scale. Used to predict the permeate flux on a semi-industrial pilot plant (with effective filtration area of 0,22 m²), this model gave a good match between the experimental and calculated performances. Permeate was collected aseptically and stored at 4, 20 and 37 °C for 90 days. The samples were submitted to physical-chemical and microbiological evaluation during the storage. Roselle extract storage at 4 and 20 °C was appropriate for consumption after a 3 month shelf life. No significant difference according to color and smell in accordance with 95 % of panelists were noted between the extracts at 4 or at 20 °C and the original extract.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, microfiltration, sterilization, optimization, volumetric reduction ratio

INTRODUCTION

Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae) known as bissap in Senegal is an annual crop. Commonly called Roselle or red sorrel, karhade, *Hibiscus sabdariffa* is also widely grown for its red calyx in Central, East and West Africa, as well in southeast Asia and Central and south America (178). In these countries, in most cases, it is cultivated with the purpose of using the calyx of their flowers to produce soft drink highly appreciated all over the world for the particular sensation of freshness conveyed and his ruby colour due to its high content in anthocyanin (177, 178, 205). In addition these extracts are also used in folk medicine for their potential health effects (214-216). Indeed, beneficial effects for controlling human diseases have also been reported in the literature including the reduction of risks of coronary heart disease, cancer, and stroke (217-222). These positive physiological effects could be related to the presence of anthocyanins with a high antioxidant activity (25, 205). However, the main problem of anthocyanins is their instability in the presence of endogenous enzymes [e.g., peroxidase, polyphenoloxidase, and β -glucosidase], oxygen, ascorbic acid, light, metallic ions (195, 223-227) and mostly heat (184, 192, 198, 228). Indeed Cisse et al. (2011) show that using high temperature during extraction and stabilization leads to a rapid decrease in red color of the product during storage.

Cold process membrane technologies represent an alternative to high-temperature treatments. Crossflow microfiltration (CMF) has been applied successfully to some highly thermosensitive juices, resulting in microbiologically stabilized clarified juice that preserves the major part of the fruit's original aroma (7, 58, 229, 230). The nutritional quality is also maintained. The application of CMF to roselle extract has not yet been reported. In the aqueous extract of roselle, the absence of compounds such as hemicelluloses, cellulose, tannins, proteins, starch and low content of pectins, may limit the fouling during CMF.

The research described in this paper was carried out to study the use of crossflow microfiltration for the stabilization of roselle extract in the first step. In the second part, studying the microfiltration of roselle extract in accordance with the volumetric reduction ratio (VRR) we aimed to develop a strategy that would allow a fruit juice industry to efficiently produce stabilized roselle juice. A simple predictive model for permeation flux decline is also used in this work.

EQUIPMENT AND METHODS

Preparation of extracts

The roselle extract was prepared with dried calyces from a Senegal Thai variety (179) mixing them with demineralized water using a mass ratio of calyx to water of 1:15. After 3 hours, the extract was then filtered successively through a stainless steel sieve (1 mm) and a bag filter system made in polyester with 5 μ m of micron rating (GAF, Belgium). The dried calyces were obtained after sundrying during seven days on mats directly on the floor.

Microfiltration

Two pilots were implemented during this study: a semi-industrial pilot and a laboratory pilot. The semi-industrial microfiltration unit IMECA (Clermont L'Herault, France) featured a tubular ceramic membrane (Membralox® 1P19-40, Pall Exekia, Bazet, France), with the following attributes: 19 channels with an internal diameter ($d = 4 \times 10^{-3}$ m), length ($L = 1.02$ m), average pore size diameter of $0.2 \mu\text{m}$, and a total effective filtration area of 0.22 m^2 . Temperature was controlled, using cold water circulating through a tubular heat exchanger. The pilot unit featured a closed loop that was fed by a positive-displacement pump. The pump itself was regulated by a geared engine that had an integrated frequency converter to ensure constant transmembrane pressure (P_{tm}). This pressure was manually controlled for the entire duration of the trials. Included in the close circuit, a centrifugal pump gave an axial feed flow rate of $U = 4.0 \text{ ms}^{-1}$. The TIA laboratory pilot (Bollene, France) was featured by four identical mono-tubular membranes with an effective filtration area of 0.0055 m^2 each membrane and $0.2 \mu\text{m}$ pore size. The process conditions were crossflow velocity between 2 to 6 m.s^{-1} , temperature of 25 to $35 \text{ }^\circ\text{C}$ and applied transmembrane pressure from 1 to 3.75 bar .

The trials were carried out following two modes: with and without concentration. According to the concentration mode followed, without retentate extraction, the volumetric reduction factor at time t (VRR_t) was defined as the ratio between the total amount of juice fed into the close circuit and the final volume of retentate which remained constant throughout trials and corresponded with the total volume of the circuit. Then, the VRR_t was calculated according to equation (1).

$$VRR_t = 1 + \frac{V_p}{V_c} \quad (1)$$

with V_p , V_c respectively the volume of permeate at time t and the volume of the circuit. With this mode, all trials were done with continuous feed of extract and constant collection of permeate without retentate extraction. The feed tank contained 60 and 3 L for the IMECA and TIA pilot respectively. Permeation fluxes (J_p) were determined every 10 min by measuring the volume of permeate collected for 1 min. At the end of the experiments, the flux resistances were calculated by the resistance in series model (Eq. 2).

$$R_t = R_m + R_f = \frac{\Delta P}{\mu J_p} \quad (2)$$

in which J_p is the permeate flux ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), ΔP is the applied transmembrane pressure (Pa), μ is the viscosity of the permeate (Pa.s), R_t the total resistance (m^{-1}), R_m is the intrinsic membrane resistance measured with water and R_f the fouling layer and polarization resistance

Stability during storage

During the trials with the semi-industrial pilot, microfiltered extract was collected in sterilised glass bottles using a closed system. The bottles were stored avoiding light exposure in stove (Memmert, Schwabach, Germany) at 37 °C, in a positive ventilated enclosure (LIEBHERR, Germany) at 20 °C and in a refrigerator (Hoelzle & Chelius HC, Germany) at 4 °C. Samples were analyzed every 15 days during 30 days and every 30 days during 2 months.

Physical and chemical analysis

All extracts were analyzed for pH, titratable acidity, and density using standard methods (231). The total soluble solids (TSS) content was measured with an Abbe refractometer (Atago, Japan), Vitamin C (ascorbic acid and dehydroascorbic acid) was assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (186) using an Agilent 1100 system (Massy, France). Sucrose, fructose, and glucose were determined according to (35).

The total anthocyanin content was assessed by the pH differential method (162). All absorbance readings were done against distilled water, which was used as control. Spectrophotometric measurements were carried out using Shimadzu spectrophotometers (UV-1605, Kyoto, Japan). Concentrations were expressed as delphinidin 3-xylosylglucoside equivalents for roselle (MW = 577 g.mol⁻¹). The molar extinction coefficient at pH 1 and 510 nm, used for calculation, was 26000 L.mol⁻¹.cm (184). All of the reagents used were of analytical grade and were purchased from Sigma (L'isle d'Abeau, France).

Alcohol insoluble solids (AIS) such as pectins were determined by dispersing a previously weighed homogenous aliquot of retentate into boiling ethanol (80 vol%) (43). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was done in accordance with Ou et al (164), using a microplate spectrofluorimeter with 96-well plates made in black polypropylene (165). The ORAC value was expressed as Trolox equivalents (mmol.L⁻¹). Total flora, yeasts, and moulds, fecal and total coliforms were assessed using standard methods (187).

Permeate flux Modeling

Based on the thin-film theory, permeation flux (J_p) can be expressed (61) by the general equation:

$$J_p = k \cdot \ln (VRR_{\infty} / VRR_t) \quad (3)$$

where, VRR_{∞} and VRR_t are the volumetric reduction factor at time ∞ and t , k is a global mass transfer coefficient. After linearization the equation (3) becomes:

$$J_p = a - b \ln VRR \quad (4)$$

with $a = k \ln(VRR_{eq}) = J_p$ (VRR = 1) and $b = k$. The coefficient a and b were fitted using the least square method (Sigma Plot V.10).

Sensorial test

Sensorial tests used the triangular test method with a panel of 20 regular consumers of sorrel drink. Two descriptors were chosen: colour and smell. First, to evaluate the effect of the microfiltration process on sensorial quality, the clarified extract obtained after microfiltration was compared with the original extract. Secondly, to evaluate the effect of the storage temperature on sensory quality, extract at 4, 20 and 37 °C were compared with each and with the original extract.

RESULTS AND DISCUSSION

1-Optimisation of the process at laboratory scale

Two sets of tests were carried out. A first at constant VRR equal to 1 was done followed by a second with increased VR

9R up to 20.5. For all tests, the temperature was set at 35 °C according to the thermal degradation of anthocyanins (184). The crossflow velocity was fixed at 6 m.s⁻¹. Thus, only the effects of transmembrane pressure on permeate flux has been studied.

Figure 1 shows some examples of permeate flux at VRR 1 as function of processing time where we observed a typical behaviour of a crossflow microfiltration process curve. Up to 40 min, an acute decay of the flux density of permeate was noted, followed by a period where flux stabilization occurred. The sharp initial flux decline was due to the formation of a fouling layer mainly caused by the alcohol-insoluble solids (**Table 1**) in our case and the concentration polarization. Similar results were observed during microfiltration of many juices, drinks, aqueous solutions, water (61, 229, 232, 233). As shown in **Figure 2** (VRR = 1), by increasing the transmembrane pressures (ΔP), the flux density of permeate increases significantly up to ΔP values of 2.5 bar. Between 1.2 and 2.5 bar the permeate flux increases by 35 % against 5 % when the transmembrane pressure ranges from 2.5 to 3.7 bar. Permeate flux ranges between 136 and 193 L.h⁻¹.m⁻². At the same time, the total resistance (R_t) increases with the transmembrane pressure (**Figure 3**). It's clear that the intrinsic resistance membrane (R_m) was insignificant compared to the resistance due to fouling (R_f) which represents 93 % of total resistance (R_t). The same distribution was reported during the microfiltration of different juice or model solutions (62, 234-237).

Flux density varies slightly in the range of the transmembrane pressures tested, it is unlikely that the increasing of the fouling resistance is linked to an increased in concentration polarization. It would therefore be related to the increase of the hydraulic resistance of the external fouling that may be compressible.

These initial trials show that crossflow microfiltration of roselle extract at VRR 1 can be carried out at transmembrane pressure of 2.5 bar with higher flux density of permeate around $185 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

To illustrate the influence of the VRR on flux density, crossflow microfiltration was carried out with a roselle extract having the similar characteristics than the extract used at VRR 1 (**Table 1**). In that case the laboratory pilot of microfiltration was constantly fed with roselle extract to keep the hold-up volume constant (3 L) while permeate was recovered. After 17 L of roselle extract, feeding was stopped. As shown in **Figure 4**, by increasing the VRR, the flux density of permeate decreased whatever the applied transmembrane pressure. However, for a high VRR value, permeate flux remains proportional to the transmembrane pressure. Using **Figure 4** we can predict permeate flux as a function of transmembrane pressure and volumetric reduction ratio, during crossflow microfiltration of roselle extract. For example, at 2.1 bar of transmembrane pressure, permeate flux is at least of $50 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. For industrial purposes, the VRR is directly related to the yield of the operation (Equation 5) and is an essential indicator of the microfiltration viability. For each product we can determine the critical values of VRR and flux density. In our case at VRR 20, the maximum permeate flow is $95 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ to a transmembrane pressure of 3.7 bar with a yield of 95 %. This pressure is significantly different from that found during microfiltration at VRR 1. With a VRR of 20 permeate flow is 1.5 times lower at 2.5 bar of transmembrane pressure than at 3.7 bar. Moreover, the time required to reach VRR 20 remains unchanged between 2.5 and 3.7 bar of transmembrane pressure. It's of 370 min. With 1.5 and 2.0 bar, the time required to reach VRR 20 is respectively 480 and 390 min.

$$\eta_p = \left(1 - \frac{1}{VRR}\right) \quad (5)$$

where η_p is the yield of production of permeate (%) and VRR the volumetric reduction ratio.

As in trials at VRR 1, the total resistance (R_t) increases with transmembrane pressure during the tests at increasing VRR. Furthermore, it logically increased with the volumetric reduction ratio (**Figure 5**) that is correlated to the increase of the fouling power of the product when it is concentrated.

According to these results, the parameter optimization of the crossflow microfiltration at VRR 1 does not seem to be the best way to choose the value of parameters for industrial purpose. The hypothesis that considers that the values of optimum parameters of crossflow microfiltration are both the same at constant and increasing VRR, is clearly not validated in our case.

2- Permeate flux Modeling

In order to predict permeate flux during crossflow microfiltration the model based on the thin-film theory is used according to Eq.4. As shown in **Figure 6** experimental data matched the model well.

To compare the accuracy of the model in predicting experimental permeate flux value of flux densities were performed at two transmembrane pressures 1.5 and 3.0 bar. Experimental permeate flux were then compared with calculated values (**Table 2**). In all cases, the model gave similar results, with estimates being close to the experimental values. Model accuracy was thus verified, and the approach followed in this study was validated. Using the thin-film theory with linear regression coefficient between 0.994 and 0.980, **Figure 7** gave k and VRR_{∞} values according the transmembrane pressure. Up to 2.5 bar of transmembrane pressure, value of k is almost constant while VRR_{∞} increases with pressure. From 2.5 to 3.7 bar, k decreases. It therefore seems that the fouling particles induce limiting permeation flux, independent on pressure when of the gel or cake layer reach equilibrium. The gel or cake layer built up from roselle extract appears squeezable and is subject to compression or even flocculation.

3-Validation at a semi-industrial scale

Based on previous results, further trials of crossflow microfiltration were carried out with a semi-industrial pilot. So, the model established in the laboratory pilot was used to predict the permeate flux as a function of the volumetric reduction ratio. **Figure 8** shows the variation of permeate flux during a microfiltration trial of the roselle extract in order to produce a commercial sterile extract. The behavior of the permeate flux could be separated into two steps. First there was a decay of the permeate flux followed by a period when the decrease was less important tending to stabilization. Similar behavior of permeate flux has been reported for different juices (62, 230). By increasing the VRR, the flux density of permeate decreased to below $95 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ when the VRR reach 3. Interestingly, a VRR value of 3 was seen when the permeate flux remained stable. These results are consistent with those obtained with the laboratory pilot. According to these results, the costs of producing commercial sterile roselle extract would be competitive and would have a higher production yield. Calculated permeate flux using the model are greater than 9 to 15% than those obtained experimentally. Therefore, model developing with the laboratory pilot can be used to validly predict the permeate flux during semi-industrial pilot at transmembrane pressure ranging between 1.2 to 3.7 bar and at increasing VRR up to 20.

4- Cold sterilization of roselle extract by crossflow microfiltration

Table 1 presents the results of physical-chemical and microbiological analysis of the original extract and the extract after crossflow microfiltration. Except vitamin C, alcohol-insoluble solids (AIS) such as pectins and total flora, all parameters have very close values. The vitamin C content of the clarified extract is reduced only by 5 %. This loss may have been due to oxygen exposure and could have been reduced by implementing a degassing treatment before

microfiltration. Antioxidant capacity decreased also slightly from 166 to 151 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$. As the content of anthocyanin remains constant; the slight reduction of antioxidant capacity may be due to vitamin C loss. Pectin content was reduced by 90 % after MFT. Microbiological analyses of the permeate extract showed that this product contains no yeasts and moulds, fecal coliforms nor total coliforms. The total flora was under 30 CFU.mL⁻¹. The microorganisms were retained by the membrane. These parameters were maintained during the storage period of 90 days, at temperature conditions of either 4, 20 and 37 °C. The low pH also contributes to the microbiological stability of the product. In fact during the storage time pH and titratable acidity of microfiltered extract did not change at all storage temperature. However anthocyanins and vitamin C content decrease regularly (**Figure 9**). After 90 days at 37 °C losses of 68 and 52 % were respectively observed for vitamin C and anthocyanins. While at 4 and 20 °C losses in anthocyanins are respectively of 15 and 30 % after 90 days of storage.

Anthocyanin and vitamin C contents decreased during storage according to time and temperature for all the storage temperatures. Linear regression confirmed that the degradation of these nutritional compounds in the roselle extract during storage can be fitted by a first-order reaction model. So, the first-order reaction rate constants (k), half-lives (t_{1/2}) and decimal reduction time (D) were calculated by the following equations and their values are given in **Table 3**.

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -k \cdot t \quad (6)$$

$$t_{1/2} = -\ln(0.5) \cdot k^{-1} \quad (7)$$

Whatever the storage temperature is, it has a strong influence on the degradation of anthocyanins and vitamin C. In fact, storage at 37 °C resulted in a much faster degradation compared with refrigerated storage at 4 °C. For example, with vitamin C, reaction rate k ranges from 5.787 to 13.888 x 10⁻⁸ s⁻¹ to respective storage temperatures of 4 and 37 °C. The t_{1/2} values of roselle anthocyanins were 198 days at 4 °C, 115 days at 20 °C and only 77 days at 37 °C. Vitamin C appears to be more susceptible to degradation than the anthocyanins during storage. Indeed at 20 °C, the half-life of vitamin C was of 87 days against 115 days for anthocyanins with reaction rate k of 9.259 and 4.630 10⁻⁸ s⁻¹ respectively. Isothermal kinetic parameters determined according to (184) using the two Arrhenius and Ball models are presented in **Table 4**. All models were observed to properly match the temperature dependence of k and D (0.990 < R² < 0.999). The activation energies were 18.9 and 20.4 kJ.mol⁻¹ respectively for vitamin C and anthocyanin while value of D₀ were respectively of 4.36 and 6.20 x 10⁷ s. These results confirm the greater sensitivity to the degradation of vitamin C compared to anthocyanin during storage at temperatures between 4 and 37 °C. Compared to other work (CISSE et al., 2010) anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* appears to have greater stability after microfiltration. In fact, extracts obtained at 30 °C or 100 °C and then stabilized by pasteurization at 90 °C for 5 min shows values of D₀ two times smaller and a z factor value of 67 °C against 83 °C for the anthocyanin in microfiltered roselle extract.

However, these differences particularly in terms of colour were not verified with visual observation according sensorial tests using the triangular test method with a panel of 20 regular consumers of sorrel drink. Indeed according to the sensorial tests, no significant differences (at 95% confidence level) could be noticed between the extract at 4 °C and the extract at 20 °C. Compared to a sample prepared in situ (original extract) and have not undergone the microfiltration treatment, the two extracts at 4 and 20 °C show no significant differences according to color and smell with the original extract in accordance with 95 % of panelists. The crossflow microfiltration process used had no significant effect on the sensorial quality of the extract. On the other hand, all the tasters agreed that the extract stored at 37 °C has a significant difference in colour compared to other extracts.

These results show the potential of crossflow microfiltration to sterilize roselle extract and to keep at an acceptable level for nutritional and sensory qualities of the product.

CONCLUSION

Crossflow microfiltration presents great potential to stabilize roselle extract. The stabilized extract presents physico-chemical, nutritional and sensorial properties that are comparable with the fresh roselle extract. The cold pasteurised product is stable when stored at 4 and 20 °C during 90 days. Roselle extract remained a good source of anthocyanins with microbiological safety requirements. Also, an acceptable level for nutritional and sensory qualities of the product was preserved. Crossflow microfiltration of roselle extract makes it possible to reach a high average permeation flux density of about $95 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ at $\text{VRR} = 20$ and giving a global yield of 95 %. Transmembrane pressure presents a high effect in permeate flux and total resistance that is composed by the resistance due to fouling at 93 %. Optimizing transmembrane pressure at $\text{VRR} = 1$ and at higher VRR did not give the same optimum values. So, it seems necessary to perform the optimization of various parameters of microfiltration at increasing VRR. Especially in industry, the VRR is directly related to the yield of the operation and is an essential indicator of the microfiltration viability. The predictive model for permeation flux developed gives good correlation between the experimental flux density of permeate and those calculated with the model.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) and CIRAD for its financial support

TABLES

Table 1. Characteristics of roselle extract original and microfiltered with the semi-industrial pilot, numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions ($T = 35 \pm 2$ °C, $U = 4 \text{ m.s}^{-1}$, $1 < \text{VRR} < 4$, $\Delta P = 1.50 \text{ bar}$).

Parameters	Roselle extract original	Roselle extract microfiltered
pH	2.25 (0.05)	2.30
Total soluble solids (TSS) (g/kg)	45 (2)	45 (2)
Titratable acidity (g malic acid/kg)	185 (9)	183 (7)
Vitamin C (g/kg TSS)	10 (0.6)	9.5 (0.2)
Sucrose (g/kg TSS)	3.1 (0.2)	3.0 (0.1)
Fructose (g/kg TSS)	17.5 (1.1)	17.0 (1.0)
Glucose (g/kg TSS)	23.4 (1.3)	22.8 (1.5)
Anthocyanins (mg.L ⁻¹)	254 (10)	250 (12)
ORAC (μmol.Trolox.g ⁻¹)	166 (1.3)	151 (1.1)
Alcohol insoluble solids (g.kgTSS ⁻¹)	21 (1.2)	2.5 (0.2)
Total flora (CFU.mL ⁻¹)	2.10^3	< 30
Yeast and moulds (CFU.mL ⁻¹)	1.10^2	< 30
Fecal coliforms (CFU.mL ⁻¹)	0	0
Total coliforms (CFU.mL ⁻¹)	0	0

Table 2. Experimental and calculated permeate flux following the model with the laboratory pilot ($T = 35 \pm 2$ °C, $U = 6 \text{ m.s}^{-1}$, $1 < \text{VRR} < 21$, $1 < \Delta P \text{ (bar)} < 4$).

VRR	1.5 bar		3.0 bar	
	Experimental	Model	Experimental	Model
1	162	161	188	189
5	95	92	138	131
10	66	62	106	107
15	46	44	90	93
20	38	32	79	82

Table 3. Effect of temperature on the k , t_{12} , D values of anthocyanin and vitamin C degradation in microfiltered roselle extract obtained with the semi-industrial pilot ($T = 35 \pm 2$ °C, $U = 4 \text{ m.s}^{-1}$, $1 < \text{VRR} < 4$, $\Delta P = 1.50 \text{ bar}$), numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions

Compounds	Temperature (°C)	$k \times 10^{-8} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (days)}$	$D \text{ (days)}$
Anthocyanin	4	1.157 (0.002)	198	658
	20	4.630 (0.004)	115	384
	37	9.260 (0.005)	77	256
Vitamin C	4	5.787 (0.002)	139	461
	20	9.259 (0.003)	87	288
	37	13.888 (0.008)	58	192

Table 4 Kinetic parameters for the anthocyanin and vitamin C degradation during storage following Arrhenius and Ball models, numbers in parentheses indicate the standard deviation of three repetitions.

Compounds	Arrhenius model			Ball model		
	$k_{\infty} \times 10^{-4}$ (s ⁻¹)	E _a (kJ.mol ⁻¹)	R ²	D ₀ x10 ⁷ (s)	z (°C)	R ²
Anthocyanin	2.97 (0.02)	20.4 (1.2)	0.995	6.20 (0.25)	83 (2)	0.990
Vitamin C	2.18 (0.002)	18.9 (1.3)	0.999	4.36 (0.12)	91 (1)	0.996

FIGURES

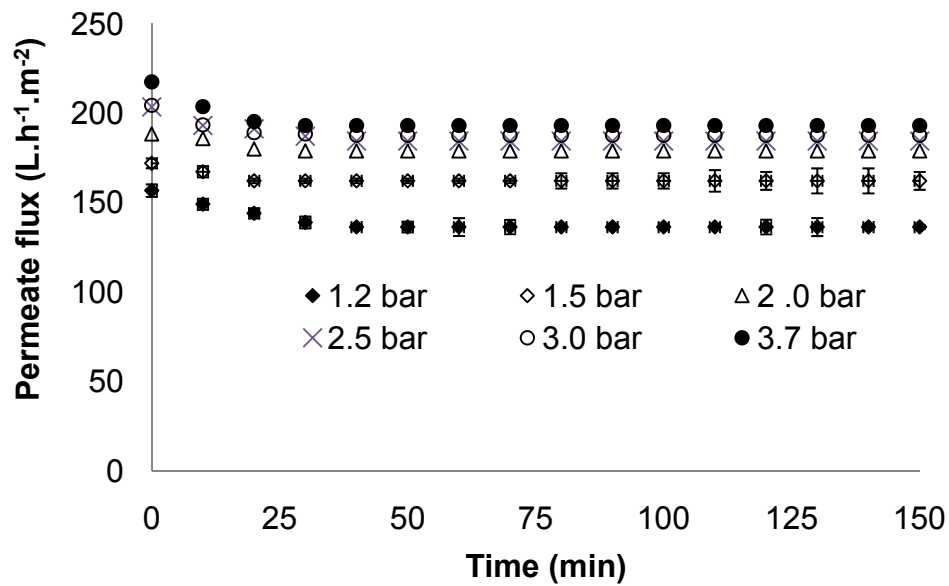


Figure 1. Permeate flux during the crossflow microfiltration of roselle extract at VRR 1 and at different transmembrane pressure with the laboratory pilot ($T = 35 \pm 2^\circ\text{C}$, $U = 6 \text{ m.s}^{-1}$), (error bars represent standard deviation for $n=3$).

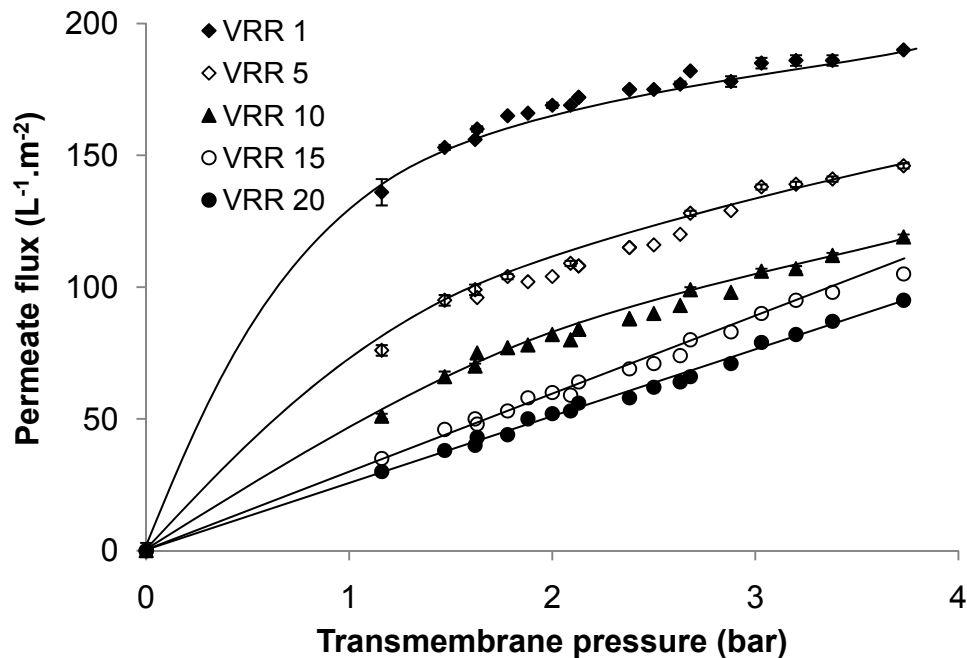


Figure 2. Permeate flux vs transmembrane pressure during the crossflow microfiltration of roselle extract at different volumetric reduction ratio (VRR) with the laboratory pilot ($T = 35 \pm 2^\circ\text{C}$, $U = 6 \text{ m.s}^{-1}$).

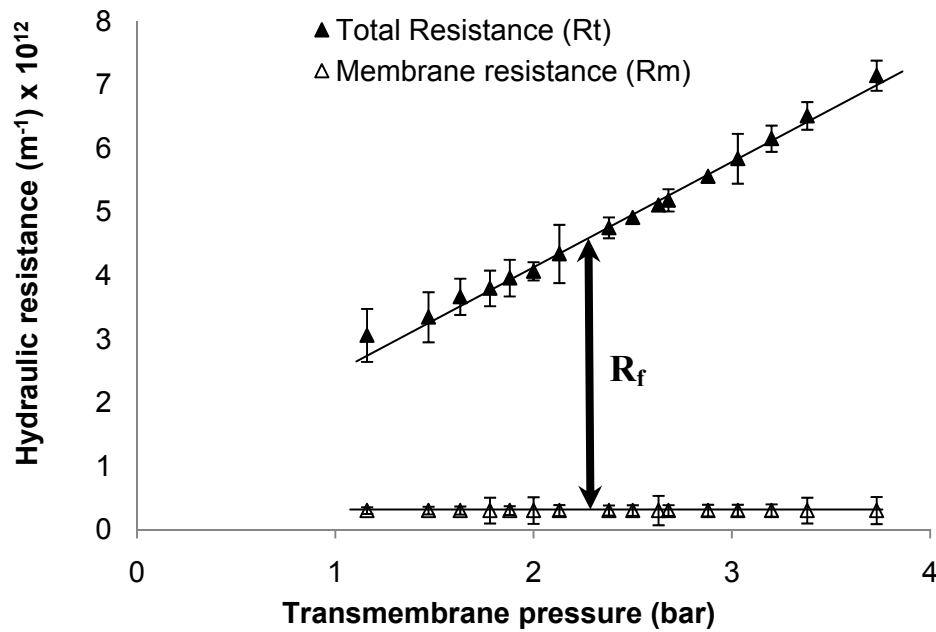


Figure 3. Hydraulic résistances vs transmembrane pressure during crossflow microfiltration of roselle extract with the laboratory pilot ($T = 35 \pm 2$ °C, $U = 6 \text{ m.s}^{-1}$) (error bars represent standard deviation for $n=3$).

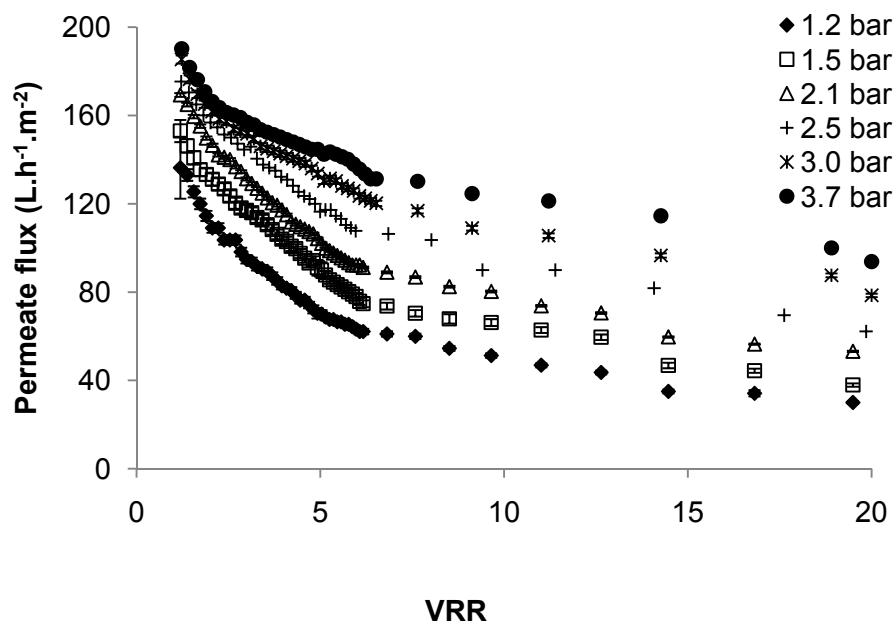


Figure 4. Permeate flux vs volumetric reduction ratio (VRR) during the crossflow microfiltration of roselle extract at some examples of transmembrane pressure with the laboratory pilot ($T = 35 \pm 2$ °C, $U = 6 \text{ m.s}^{-1}$), (error bars represent standard deviation for $n=3$).

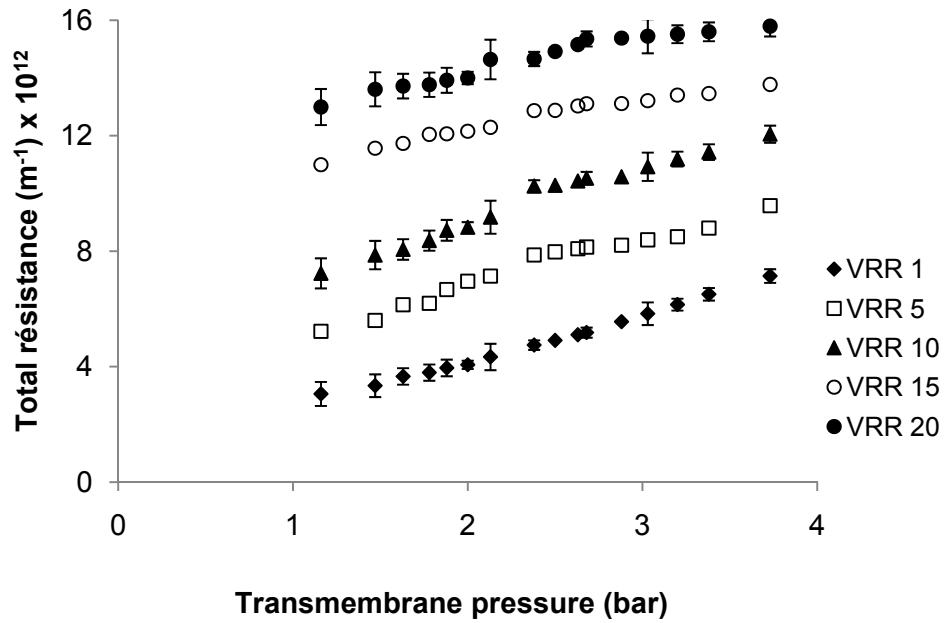


Figure 5. Total résistance vs transmembrane pressure at different volumetric reduction ratio (VRR) during crossflow microfiltration of roselle extract with the laboratory pilot ($T = 35 \pm 2$ °C, $U = 6 \text{ m.s}^{-1}$) (error bars represent standard deviation for $n=3$).

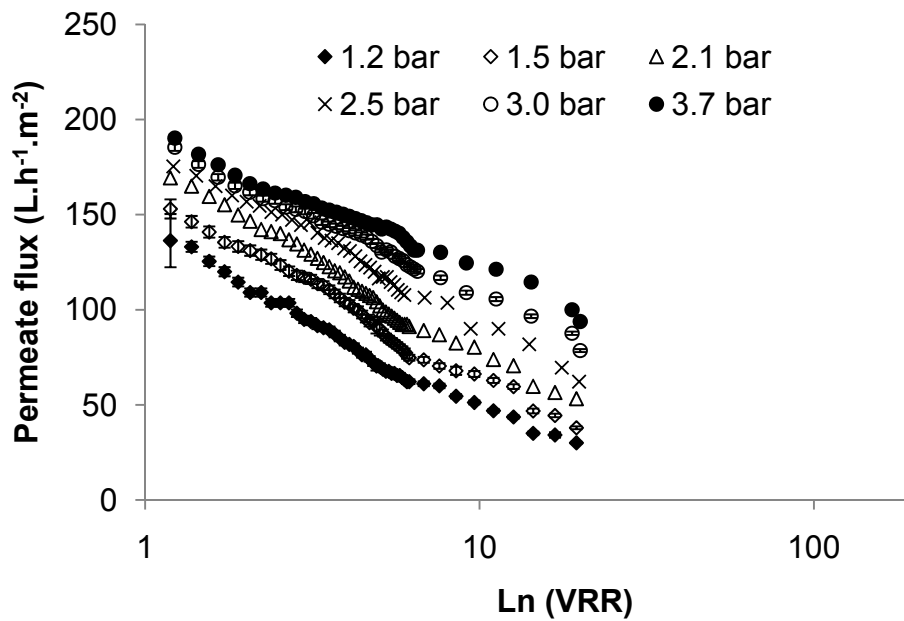


Figure 6. Permeate flux vs logarithm of volumetric reduction ratio (VRR) during the crossflow microfiltration of roselle extract at different transmembrane pressure with the laboratory pilot ($T = 35 \pm 2$ °C, $U = 6 \text{ m.s}^{-1}$) (error bars represent standard deviation for $n=3$).

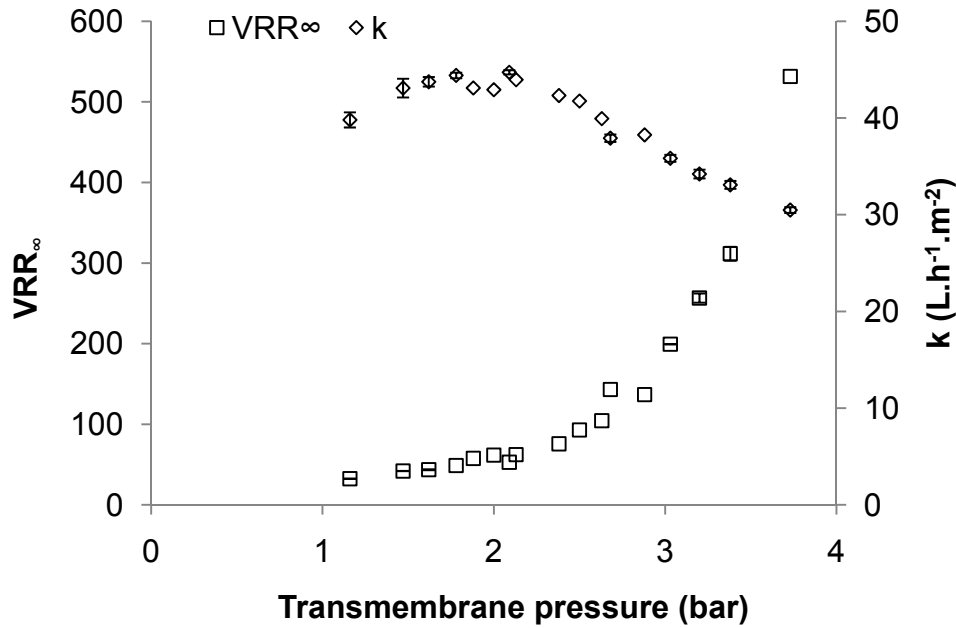


Figure 7. Model parameters values (VRR_{∞} and k) vs transmembrane pressure for crossflow microfiltration of roselle extract with the laboratory pilot ($T = 35 \pm 2$ °C, $U = 6$ m.s⁻¹) (error bars represent standard deviation for $n=3$).

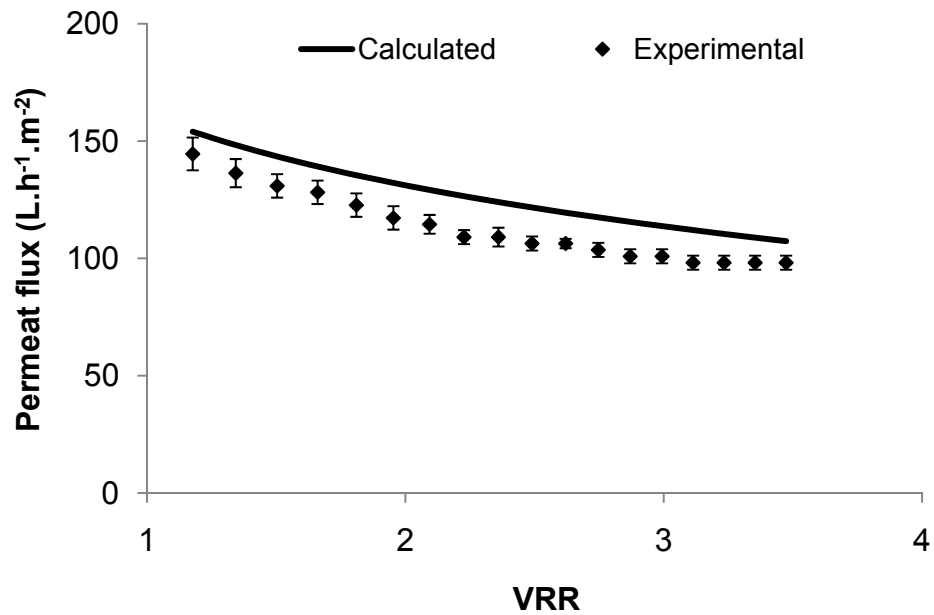
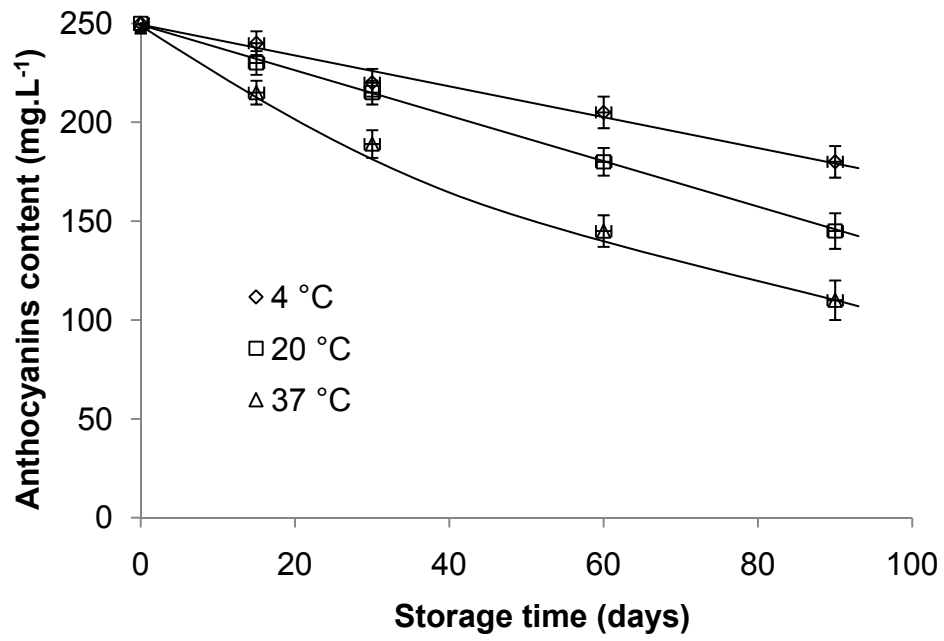


Figure 8. Calculated and experimental permeate flux vs volumetric reduction ratio (VRR) during crossflow microfiltration of roselle extract with the semi-industrial pilot ($\Delta P = 1.50$ bar, $U = 4$ m.s⁻¹, $T = 35 \pm 2$ °C)

(1)



(2)

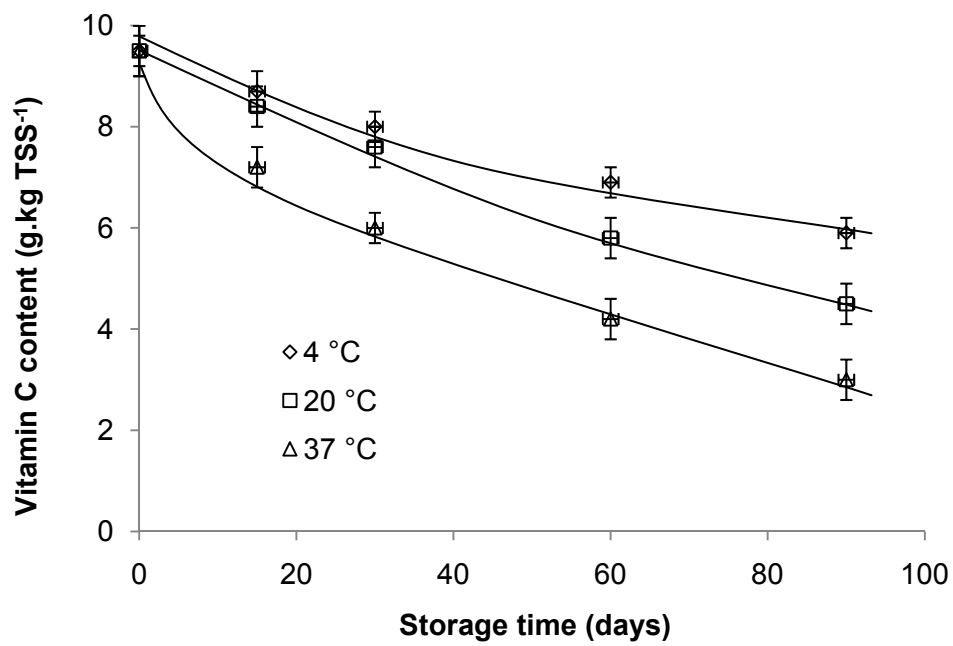


Figure 9. Evolution of the contents of anthocyanin (1) and vitamin C (2) during the storage at 4, 20 and 37 °C

4- Pré-concentration par ultrafiltration et nanofiltration

Comme nous l'avons souligné dans la partie bibliographique, les utilisations de l'ultrafiltration et de la nanofiltration pour le traitement d'extraits de plante tel que ceux d'*Hibiscus sabdariffa* sont rares. L'application de ces procédés pour concentrer à froid les anthocyanes contenus dans un extrait d'*Hibiscus sabdariffa* va être évaluée au cours de ce travail (Publication n° 7).

Huit membranes d'ultrafiltration et 10 de nanofiltration provenant de divers fabricants ont été testées sur un extrait d'*Hibiscus sabdariffa* obtenu à une température de 35 °C. La gamme de pressions transmembranaires étudiée s'échelonne de 5 à 30 bar (FRV = 1). Les résultats obtenus sur les membranes d'ultrafiltration montrent deux types d'évolution de la densité de flux en fonction de la pression transmembranaire : 1) la densité de flux augmente proportionnellement avec la pression transmembranaire. C'est le cas des membranes dont le seuil de coupure est inférieur ou égal à 20 kDa ; 2) la densité de perméat maximale est atteinte dès 5 bar, comportement qui se retrouve au niveau des membranes dont le seuil de coupure est supérieur à 20 kDa. Les taux de rétention de l'extrait sec soluble et de l'acidité titrable varient de 13 à 78 % et 5 à 75 % respectivement. La rétention en anthocyanes est comprise entre 24 % et 97 %.

Les essais réalisés sur les membranes de nanofiltration donnent des flux de perméat aussi élevés que ceux des membranes d'ultrafiltration. De plus, les taux de rétention sont plus importants : au moins 97 % pour tous les composés même à des pressions transmembranaires faibles. L'évaluation des performances énergétiques montre que les membranes GE Osmonics DK et DL sont les plus efficaces en terme de consommation énergétique. Ainsi, la membrane DK a été choisie pour valider ces résultats obtenus sur pilote de laboratoire. Cette validation réalisée sur une installation semi-industrielle équipée d'une membrane DK de 2,5 m², a permis d'augmenter la teneur en extrait sec soluble de l'extrait aqueux de 41 à 250 g.kg⁻¹ à une pression transmembranaire de 20 à 30 bar et à une température de 35 °C. La qualité du concentré est restée très proche de l'extrait initial avec une rétention complète des anthocyanes.

L'ultrafiltration et, plus encore, la nanofiltration sont donc des alternatives pertinentes pour la production de concentrés d'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* à basse température. Le faible coût énergétique de ces procédés les rendent potentiellement intéressants pour pré-concentrer l'extrait avant une étape finale de concentration par évaporation osmotique. Des travaux complémentaires seraient toutefois nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes qui régissent la rétention des différents composés.

Publication n° 7

**Sélection of ultrafiltration and nanofiltration
membranes suitable for the concentration of anthocyanins from roselle
(*Hibiscus sabdariffa* L.)**

Soumis au Journal Membrane Science

**SELECTION OF ULTRAFILTRATION AND NANOFILTRATION MEMBRANES
SUITABLE FOR THE CONCENTRATION OF ANTHOCYANINS FROM ROSELLE
EXTRACT (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.)**

CISSE MADY¹, DORNIER MANUEL², VAILLANT FABRICE³

¹Ecole Supérieure Polytechnique, Université Cheikh Anta Diop, B.P. 5085, Dakar Fann, Sénégal

²UMR QUALISUD, CIRAD, Montpellier SupAgro, 73 rue J.F. Breton, TA B-95/16, F-34398 Montpellier cedex 5, France

³Centro de Investigación de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Código Postal 2060, San José, Costa Rica

ABSTRACT

Ten different flat-sheet nanofiltration membrane and eight tight ultrafiltration membranes with nominal MWCO ranging from 200 and 150,000 Da were tested with a Roselle extract using a pilot system featured with a membrane cell with an effective area of 0.0133 m². Permeate flux were registered for different transmembrane pressures. 5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 MPa, while keeping all other operating conditions constant (VRR 1, Temperature 35°C and cross-flow velocity to 0.3 m·s⁻¹). Retention values of total soluble solids, acidity, and anthocyanins increases with transmembrane pressure. With similar permeate flux at average transmembrane pressure, retention of anthocyanin is significantly higher for nanofiltration membranes than for ultrafiltration membranes. A membrane was selected, on the basis of mass transfer coefficients, retention of compounds of interest and energy consumption per liter of permeate, to perform an industrial trial (2.5 m² filtration surface) to concentrate a Roselle extract from 4 to 25 g total soluble solids.100 g⁻¹ with 100 % retention of anthocynin. No significant changes were observed comparing the quality of concentrate with initial Roselle extract.

Keywords: ultrafiltration, nanofiltration, concentration, *Hibiscus sabdariffa*, anthocyanins

INTRODUCTION

The anthocyanins comprise the largest group of water soluble pigments in plants. They are highly appreciated by the food industry for their coloring properties, which can give to foods various hues of red and violet (238, 239). Moreover, apart from their physiological roles in plants, they are regarded as important components in human nutrition which is supported by numerous studies that report high positive correlation of fruit or vegetable pigment content and antioxidant capacities (240-242). Many edible plants are sources of anthocyanins (172-175). These include roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa*) (176-178). Several authors have confirmed that *Hibiscus sabdariffa* are a good source of dietary antioxidants, and calyx is known to contain high amounts of anthocyanins that can be as much as 2.5 g/100 g DW (243, 244). The calyx contains two main anthocyanins: delphinidin-3-sambubioside or delphinidin-3-xylosylglucoside or hibiscin and cyanidin-3-sambubioside or cyanidin-3-xylosylglucoside or gossypicyanin.

Concentration of anthocyanins or other polyphenols using membrane technologies is of interest because of the low temperatures involved, avoiding possible thermal degradation of compounds of interest. Moreover, the fractionation and subsequent purification and concentration of anthocyanins is a matter of health, and consequently of economical interest, for the food industry. Based on the definition of functional food that includes ingredient with an additional health-value, the global market of these products was estimated to at least at 33 billion US\$ in 2000 (103), and the commercial development of natural antioxidants from plant sources for nutritional purposes is increasing steadily since then (245).

Ultrafiltration and nanofiltration are pressure-driven membrane processes, and their properties are between those of microfiltration and reverse osmosis. Ultrafiltration is widely used for clarification of various juices (70, 71), for fractionation (246, 247). Nanofiltration has a large and growing market more in the field of water treatment processes. Approximately 65% of the NF market account for water treatment, 25% for the food and dairy industry, and less than 10% for the chemical industry (248). In the food industry, nanofiltration and ultrafiltration are used largely for the treatment of effluent (93, 94, 249, 250), for dairy industry (251-253). Applications on fruit juices, wine are growing in importance in recent years (104, 254-257). While very little use of the ultrafiltration and nanofiltration on plant extracts have been reported (105). The application of these operations for concentration of fruit juices and plant extracts may be of high interest to the food and drug industry. Indeed these process are less energy-consuming (258) than other membrane technologies such as reverse osmosis (because of the lower transmembrane pressures applied) and osmotic evaporation (since there is no need to concentrate a brine solution).

No information was found in the literature related to the performance of ultrafiltration and nanofiltration membranes for the separation and concentration of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*. The objective of this study was to determine the feasibility of the separation and concentration by ultrafiltration and nanofiltration of the anthocyanins compounds from an

extract of *Hibiscus sabdariffa* calyx by evaluating various membranes in terms of retention and permeate flux.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of extracts

To prepare the roselle extract, the dried calyces from Senegal thai variety were mixed with cool demineralized water at a mass ratio of calyx to water of 1:15 during 3 hours. The extract was then successively filtered through a stainless steel sieve (1 mm) and a bag filter system in polyester with 5 µm of micronrating (GAF, Belgium). The extract is then stored at 4 °C until use.

Experimental apparatus and membranes

Cross-flow ultrafiltration and nanofiltration experiments were performed in a pilot unit (**Fig. 1**) equipped with the Osmonics Sepa® CF II Membrane Cell system (USA) with an effective membrane area of 0.0155 m². Temperature was controlled by a thermal bath (± 0.5 °C) and permeate flux was determined by weighing the amount of permeate with a balance connected to a computer. Weight and pressure values were registered every 2 s by an electronic system. The characteristics of the eight different flat-sheet tight ultrafiltration and the ten nanofiltration membranes tested (supplied by the manufacturers), as well as the measured water permeability values are listed respectively in **Table 1**. Only new membranes were used throughout the experiment. For each trial five liters of extract were used.

Evaluation of membrane performance

Pre-conditioning of the membranes was performed for 60 min, at 35 °C, 2 MPa of transmembrane pressure and 0.3 m·s⁻¹ of cross-flow velocity with deionized water. Water permeability was determined during the last 10 min of pre-conditioning, using the slope of the plot of weight of permeate versus time. Immediately after pre-conditioning, trial with roselle extract at 4 ± 0.05 °Brix was started. Filtration temperature was set constant to 35 °C and cross-flow velocity to 0.3 m·s⁻¹. The transmembrane pressures tested for each membrane were 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 MPa, and pressure was held constant during 60 min (stabilization time). All permeate flux values were registered during the last 10 min for each pressure set point, using the slope of the plot of weight of permeate recovered versus time. After that time, the pressure was increased to the next value. In all cases, samples of permeate (50 mL) were collected for each pressure set point at the last possible moment (after the stabilization time). Samples of raw material and permeate collected were immediately frozen and kept at -20 °C until analysed. Permeate and retentate were recycled back to the feed tank in order to maintain a constant feed concentration (all experiments were performed at a volumetric reduction ratio that varied between 1 and 1.1).

In order to measure membrane selectivity towards a solute, the observed retention was calculated, as shown in the following expression for total anthocyanins:

$$R_i = \left(1 - \frac{C_{ip}}{C_{if}}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

where R_i is the observed retention of compound i (%), and C_{ip} and C_{if} the concentration of compound i in permeate and in feed ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), respectively.

Calculation of total resistance using Darcy's law

According to Darcy's law, total resistance (R_t) to permeation flow during ultrafiltration of Roselle extract was calculated as follows:

$$R_t = \frac{\Delta P}{J_p \mu_p} \quad (2)$$

where J_p is the permeate flux, ΔP is the transmembrane pressure applied and μ_p is the dynamic viscosity of the permeate.

In order to assess the resistance due to fouling and/or polarisation, the intrinsic membrane resistance (R_m) was measured during ultrafiltration of pure water using clean membranes (hydraulic permeability). Intrinsic membrane resistance was calculated as follows:

$$R_m = \frac{\Delta P}{J_w \mu_w} \quad (3)$$

where J_w ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) is the pure water flux, ΔP (Pa) is the transmembrane pressure applied and μ_w (Pa.s) is the dynamic viscosity of water.

Then, created resistance due to fouling and/or polarisation (R_a) occurring during the roselle extract filtration, was calculated as the difference between the total resistance (R_t) obtained during the filtration experiment and the membrane resistance (R_m):

$$R_a = R_t - R_m \quad (4)$$

Analyses

Total soluble solid (TSS) was measured using a digital PAL-3 ATAGO refractometer (Japan) with automatic temperature compensation. Total titratable acidity was determined with a TitroLine easy SCHOTT Instruments titrator (Germany), using 0.1 N NaOH. Vitamin C (ascorbic acid and dehydroascorbic acid) was assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an Agilent 1100 system (Massy, France) according to (186). Sucrose, fructose, and glucose were determined according to (35). The total anthocyanin content was assessed by the pH differential method (162). All absorbance readings were made against distilled water, which acted as the control. Spectrophotometric measurements were carried out using Shimadzu spectrophotometers (UV-1605, Kyoto, Japan). Concentrations

were expressed as delphinidin 3-xylosylglucoside equivalents for roselle (MW=577 g.mol⁻¹). The molar extinction coefficient at pH 1 and 510 nm, used for calculation, was 26000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ (184). All of the reagents used were of analytical grade and were purchased from Sigma (L'isle d'Abeau, France). Antioxidant Capacity Anoxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was performed in accordance with Ou et al (164), using a microplate spectrofluorimeter with 96-well plates made in black polypropylene (165). The ORAC value was expressed as Trolox equivalents (μmol.g⁻¹)

Estimation of mass transport coefficients for nanofiltration membranes

In nanofiltration, the equations describing the flow of solvent and solute across the membrane have been described by several authors (3, 259, 260). The transport of solutes through a membrane can be described by using the principles of irreversible thermodynamics (IT) to express the fluxes taking into account forces involved. For a two components system, consisting of water and a solute, the IT approach leads to two basic equations (261).

$$J_p = L_p(\Delta P - \sigma \Delta \pi) \quad (4)$$

$$J_s = \omega \Delta C + (1 - \sigma) \cdot \bar{C} \cdot J_p \quad (5)$$

where J_p is the permeate flux (m.s⁻¹), L_p is the hydrodynamic permeability coefficient (m.s⁻¹. Pa⁻¹), ΔP the hydrostatic pressure difference across the membrane (Pa), σ the solute osmotic reflection coefficient, $\Delta \pi$ the osmotic pressure (Pa) difference across the membrane estimated using the simple formula ($\Delta \pi = 133,75 \text{ TSS} / (1000 - \text{TSS})$) with TSS total soluble solids in the retentate expressed as g of TSS.kg⁻¹).

In **equation 5**, J_s is the flux of solute (kg.m⁻².s⁻¹), ω is the solute permeability coefficient (kg.m⁻² s⁻¹ Pa⁻¹), ΔC is the concentration gradient across the membrane (kg.kg⁻¹), and \bar{C} is the average concentration in the membrane (kg.kg⁻¹). Assuming that the concentration gradient across the membrane (ΔC) is constant, the **Eq. 5** can be written as follows:

$$J_s = \delta + (1 - \sigma) \cdot \bar{C} \cdot J_p \quad (6)$$

With $\delta = \omega \Delta C$.

All mass transfer coefficients were determined graphically. L_p and σ were estimated from the curves $J_p = f(\Delta P)$, $\omega \Delta C$ and \bar{C} from the curve $J_s = f(J_p)$ assuming coefficients were constant over the transmembrane pressure range studied.

Estimation of energy consumption

At a given transmembrane pressure, the power consumed E (W), can be evaluated by equation 7

$$E = \Delta P \cdot Q \quad (7)$$

where ΔP is the transmembrane pressure (Pa) and Q flow of retentate recirculated by the pump in $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. The energy E_L ($\text{W} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) needed to produce one liter of permeate during one hour of nanofiltration per square meter of a given membrane was calculated as follows:

$$E_L = \frac{E}{J_p} \quad (8)$$

With J_p the permeate flux in $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$.

RESULTS AND DISCUSSION

1- Roselle extract composition

The main components and the antioxidant capacity of the roselle extract used as raw material for the ultrafiltration and the nanofiltration experiments are presented in **Table 2**. The extract presents relatively low contents of sugars, and high levels of titratable acidity, polyphenols, and anthocyanins. This results are in agreement with those obtained by Juilani and al (244). Vitamin C content is slightly lower than the orange, strawberry and kiwi fruit juice (169). The antioxidant capacity of the roselle extract, assessed by the ORAC method, is relatively high ($182 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$), higher than baobab nectar ($88 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$), grape ($87 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$), blackberry ($72 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$), tomato ($67 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$) juices, orange ($24 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$) and strawberry ($5.3 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$) fruit pulp (169-171).

2-1- Evaluation of membrane performance

On **figure 2** are presented the permeate flux versus transmembrane pressure, obtained for 8 ultrafiltration membranes. On **Figures 2**, it can be observed different trends. Some ultrafiltration membranes (GE, GK, UP005, UP020) are characterized by a steady increase of permeate flux when transmembrane pressure increases. These membranes have a nominal MWCO equal or inferior to 20 kDa. Other group of membranes with nominal MWCO superior or equal to 30 kDa (UP 150, UH 030, UH 050), present a more classic behavior for UF membranes, as permeate flux reach a maximum around 0.5 MPa and then permeate flux decline when transmembrane pressure increases. This peculiar behavior has been observed previously for some ultrafiltration membranes and it may be due to the higher sensitivity of these organic membranes to compaction (262, 263).

Membranes from GE Osmonics manufacturer (GE, GK, GH) present high permeate fluxes taking into account their relatively low nominal MWCO, if compared to Microdyn-Nadir membranes (UP-,UH-) with much higher nominal MWCO. For example, a thin film

membrane (GH) from GE Osmonics with 1 kDa MWCO presents a very high permeation flux at 2 MPa ($34.8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) while a polyethersulphone Microdyn-Nadir membrane with 50 kDa MWCO (UP50) presents the lowest permeation flux in the same conditions ($20.4 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). This result shows that not only transmembrane pressure can affect permeate flux, but also membrane material and structure, and interactions between solute and membrane.

The total resistances (R_t) calculated for all ultrafiltration membranes at the different transmembrane pressure tested are represented in **Figure 3**. R_t includes the intrinsic membrane resistance and the fouling layer resistance due to concentration polarisation phenomena and/or gel layer formation (246, 264). As the transmembrane pressure increases, total resistance increases for all ultrafiltration membranes tested. When transmembrane pressure varies from 0.5 to 3 MPa, total resistance increases 2 to 7 fold depending of membranes. In most cases, the total resistance is higher in Microdyn-Nadir ultrafiltration membranes than in GE Osmonics membranes. This may explained the decrease of permeate flux observed previously with UP 150, UH 030 and UH 050 membranes for transmembrane pressure higher than 0.5 MPa. The resistance due to fouling and/or polarization was calculated from **equation 4** represented in all cases at least 80 % of total resistance. However, no correlations were observed between total resistance (R_t), resistance due to fouling (R_a) and the nominal MWCO. The structure of the membrane, nature of materials and the different interactions should explain the differences observed.

For nanofiltration membranes (MWCO <1 kDa), the measured permeate fluxes plotted against applied transmembrane pressure is presented in **Figure 4**. It can be observed that for all membranes tested, permeate flux increases steadily with transmembrane pressure. However, for the DK and DL membranes from GE company, for transmembrane pressures higher than 2,5 MPa, permeate flux tend to reach a top level. Some membrane compaction seems also to occur in these membranes. In general, Dow (NF-) and GE membranes (DL,DK) present the highest permeate fluxes. The membrane DL and DK with a permeate flux around $40 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ present the highest flux while the membrane NP030 from Nadir with a permeate flux of $5.75 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ yields the lowest flux.

2-2- Retention of compounds

The retention values of total soluble solids, titratable acidity and total anthocyanins calculated from eq. 1, for different ultrafiltration membranes and transmembrane pressures are presented in **Figure 5**.

For ultrafiltration membranes, retention of total soluble solids and titratable acidity varied from 13-78 % and 5-75 % respectively. Total anthocyanins retention ranged between 24 % for UP150 membrane (150 kDa MWCO) at 0.5 MPa transmembrane pressure and 97 % for UP005 (5 kDa MWCO) at 3 MPa. For all membrane, an increase in the transmembrane pressure induces higher retention of total soluble solids, titratable acidity and total anthocyanins. On **figure 6**, retention of anthocyanins using Microdyn-Nadir ultrafiltration

membranes (UP005, UP020, UH30, UH050 and UP150), was reported versus the nominal MCWO on a logarithmic scale. It can be observed that, retention of anthocyanins decreases logarithmically proportional (r^2 ranging between 0.90 and 0.93) to an increasing nominal MWCO allowing to predict retention values according to the MCWO of membranes. For a membrane with 5 kDa MWCO, retention of total anthocyanins varies from 93 to 97 % when the transmembrane pressure increases from 1 to 3 MPa. For a membrane with 150 kDa MWCO the retention of anthocyanins ranged from 28 and 62 % for the same transmembrane pressure. This confirms that membranes with higher MWCO are more sensitive to transmembrane pressure changes, in terms of total anthocyanin retention. The same trend was also observed for the total soluble solids and titratable acidity retention. This effect can also be explained by membrane compaction, which induces pore size restriction (262, 265, 266).

The results for retention values of total soluble solids, titratable acidity and total anthocyanins calculated from **eq. 1**, for different nanofiltration membranes and transmembrane pressures are presented in **Figure 7**. Retention of total soluble solids, titratable acidity and total anthocyanins ranged respectively between 58-100 %, 54-100% and 93-100 % for all the nanofiltration membrane tested. Membranes studied have therefore a high retention capacity with respect to compounds such as sugars, organic acids and anthocyanins. These results are consistent with those of several studies that have also reported high retention rates for these compounds with the same membranes (4, 105, 267). As expected, pressure increase induces higher retention of all compounds, with values over 93 % at 3 MPa transmembrane pressure for all nanofiltration membranes. Nadir membranes at transmembrane pressure lower than 1.5 MPa present the lowest retention values between 54 and 70 %, especially for the total soluble solids and the titratable acidity. It is worthy to note that retention of total anthocyanins is 100 % at 1.5 MPa transmembrane pressure for membranes from GE and Dow.

Estimation of mass transport properties for the ten nanofiltration membrane are presented in **Table 4**. It can be noted that even for membranes manufactured by the same company, significant differences ($p < 0.05$) were observed for hydrodynamic permeability (L_p). Membranes NF90, NF200 and UTC60 present value of solute osmotic reflection coefficient (σ) of 0.165, 0.360 and 0.058 respectively. The other membranes have zero value for the solute osmotic reflection coefficient. All these results tend to indicate that the transfer of solutes through the membranes is primarily convective. The average concentration in the membrane \bar{C} appears to be higher in membranes with the lowest retention rate regardless of solute compounds. The δ value tends also to decrease when retention rate increases. The smallest δ values were obtained for the membrane from Dow FILMTEC (NF90, NF200, NF270) and Microdyn- Nadir (NP010, NP030) with values respectively between 0.014 to 0.035 and 0.017 to 0.022.

With similar permeate flux at average transmembrane pressure, retention of anthocyanin is significantly higher for nanofiltration membranes than for ultrafiltration membranes, and most nanofiltration membranes tested appear to be suitable to concentrate roselle extract and produce an added-value concentrate of anthocyanin.

3-2- Selection of nanofiltration membrane

For the selection of the most suitable membrane, additionally to technical performance, economical aspects should be taken into consideration and therefore an additional study on energy consumption during nanofiltration with the different membrane tested was conducted.

Equation 8, was applied to calculate the energy (E_L) needed to produce one liter of permeate during one hour of nanofiltration per square meter of the ten nanofiltration membranes tested. In table 3 are presented the maximum value of permeate flux registered (J_{op}), the transmembrane pressure at J_{op} (ΔP_{op}), the retention value for total soluble solids, titratable acidity and total anthocyanins respectively noted R_{TSS} , R_{TA} and R_A and E_L calculated for ΔP_{op} .

It can be observed that DK and DL membranes with E_L values of respectively 4 and 3 W.L⁻¹ at 2 kPa transmembrane pressure have the lowest power consumption while NP030 membrane with E_L between 26 and 34 W.L⁻¹ at 0.5 and 3 kPa respectively is the less energy efficient. Additionally, DL and DK membranes from GE Osmonics yield also the best performance in terms of high retention, high permeate flux, low transmembrane pressure and high energy efficiency. Based on these results, industrial validation was performed with the DL membrane.

3-4- Industrial validation

The industrial validation has been performed on a semi-industrial pilot of nanofiltration at 35 °C using Roselle extract with exactly the same characteristics presented in Table 3. The nanofiltration equipment was featured with 2.5 m² of DL flat membrane. An initial transmembrane pressure of 2 MPa was applied and recirculation flow was set at 600 L.h⁻¹. As shown in Figure 8, the permeate flux decrease steadily over time even though transmembrane pressure was abruptly augmented during trial to 3 MPa in an attempt to reduce permeate flux decline. Similar results were observed during nanofiltration of different fruit juices with the same membrane (104, 258). As it was expected, total soluble solids (TSS) increased proportionally to the volumetric reduction factor (VRR), as shown in **Figure 9**. The TSS of Roselle concentrate increases from 4 to 25 gTSS.100g⁻¹, in agreement with the final concentration factor achieved for this trial (VRR around 6). Quality of concentrate was compared with initial Roselle extract (**Table 2**) on dry matter basis, and it can be observed that no significant differences existed for the content of organic acid, sugar, anthocyanins, polyphenols and ORAC values. The global retention value of total soluble solids, titratable acidity and total anthocyanins ranged between 95 and 100 %. However, a loss of 7.6 % was observed for vitamin C. This loss is probably due to the action of oxygen during the continuous recirculation of the extract. Nonetheless, these results confirm that nanofiltration can be used for concentrating Roselle extract.

CONCLUSION

Results showed that membranes with nominal MWCO less than or equal to 20 kDa present the highest potential for concentration anthocyanins of roselle extract (*Hibiscus sabdariffa*) since at 3 MPa of transmembrane pressure, the tight ultrafiltration membrane presents higher permeate flux and retention of anthocyanins which can reach 95%. Further trials must be performed at increasing VRR values. The DK and DL membranes from GE Osmonics showed at 2 MPa of transmembrane pressure present a high potential for concentration of anthocyanins from roselle extracts. Indeed, with applied transmembrane pressure between 2 and 3 MPa, the nanofiltration membrane presents higher permeate flux, and retention value over 95% for total soluble solid, titratable acidity and anthocyanin. So, an industrial trial in concentration mode shows that it is possible to concentrate a roselle extract from 4 to 25 g total soluble solid.100 g⁻¹ with a volumetric reduction ratio of 6. These results show that ultrafiltration and nanofiltration are attractive alternatives process for producing at low temperature concentrated roselle extract. Works for a better understanding of retention mechanisms of different compounds are needed to optimize the performance of process.

TABLES
Table 1. Characteristics of the tested ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF) membranes

	Manufacturer	Designation	Membrane type	Nominal MWCO (kDa)	Water permeability* (kg·h ⁻¹ ·m ⁻² ·bar ⁻¹)	Membrane resistance (m.s ⁻¹) x10 ¹³
NF	Dow FILMTEC	NF 90	Polyamide thin-film composite	200-400	2.5 (0.1)	
		NF 200		200-400	4.0 (0.5)	
		NF270		200-400	17 (1.0)	
	Toray	UTC60	Cross linked polyamide composite	- ^a	10 (0.4)	
	Koch Membrane	MPF36	Composite	- ^a	9 (0.4)	
		MPF34			3 (0.2)	
	GE Osmonics	DL	Polyamide polysulfone, thin-film	150 -300	7 (0.1)	
		DK		150-300	6 (0.3)	
	Microdyn-Nadir	NP010	Polyethersulph one	- ^a	12 (0.4)	
		NP030			4 (0.2)	
UF	GE Osmonics	GH	Thin film	1	6 (0.4) ^b	10 (0.09)
		GK		2	10 (0.7) ^b	4 (0.05)
		GE	Composite polyamide	1	6 (0.1) ^b	7 (0.07)
	Microdyn-Nadir	UP005	Polyethersulph one	5	26 (1) ^c	2 (0.05)
		UP020		20	116 (3) ^c	0.4 (0.02)
		UH030		30	119 (3) ^c	3 (0.04)
		UH050		50	237 (3) ^d	0.2(0.04)
		UP150		150	243 (5) ^d	0.2(0.03)

* at 35 °C, 20 bar and value is the mean, (standard deviation n = 3)

^a Information not supplied by manufacturer

^b water permeability determined at 20 bar

^c water permeability determined at 5 bar

^d water permeability determined at 3 bar

Table 2. Relevant composition and antioxidant capacity of the roselle extract

Parameters	Roselle extract	Extract from nanofiltration*
pH	2.30 (0.05)	2.27 (0.05)
Total soluble solids (g.kg ⁻¹)	44.89 (2)	250.01 (4)
Titrateable acidity (g citric acid.kg TSS ⁻¹)	184.12 (9)	186.26 (6)
Vitamin C (g.kg TSS ⁻¹)	10.01 (0.6)	9.24 (0.4)
Sucrose (g. kg TSS ⁻¹)	3.05 (0.2)	3.00 (0.1)
Fructose (g. kg TSS ⁻¹)	17.50 (1.1)	16.90 (0.8)
Glucose (g. kg TSS ⁻¹)	23.36 (1.3)	22.80 (1.8)
Polyphenols (g. kg TSS ⁻¹)	29.05 (1.0)	28.45 (2.04)
Anthocyanins (g. kg TSS ⁻¹)	7.05 (0.5)	7.12 (0.45)
ORAC (μmol.Trolox.gTSS ⁻¹)	405.04 (1.3)	410.87 (2.4)

Numbers in parentheses indicate the standard deviation of three analyses.

* The extract obtained after the industrial trial of nanofiltration

Table 3. Permeate flux optimal (J_{op}), transmembrane pressure optimal (ΔP_{op}) at J_{op} , retention value of total soluble solids (R_{TSS}), titrateable acidity (R_{TA}) and total anthocyanins (R_A) and E_L for the nanofiltration membrane

	J_{op} (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	ΔP_{op} (MPa)	R_{TSS} (%)	R_{TA} (%)	R_A (%)	E_L (W.L ⁻¹)
NF90	27	3	100	98	100	7
NF200	24	3	100	93	100	8
NF270	38	3	100	93	100	5
NP010	26	3	100	93	100	8
NP030	6	3	93	91	98	33
DK	36	2	100	100	100	4
DL	39	2	100	100	100	3
UTC60	40	3	100	100	100	5
MPS34	26	3	98	93	100	8
MPS36	19	3	73	73	97	10

Table 4. Main characteristics of nanofiltration membrane

	$L_p \cdot 10^{-12}$ ($m \cdot s^{-1} \cdot Pa^{-1}$)	σ	Total soluble solids		Titratable acidity		Total anthocyanin	
			δ^a ($kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)	\bar{c}^b ($kg \cdot kg^{-1}$)	δ ($kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)	\bar{c} ($kg \cdot kg^{-1}$)	δ ($kg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)	\bar{c} ($kg \cdot kg^{-1}$)
NF 90	2.84	0.165	0.014	0.001	0.019	0.001	0.032	0.003
NF 200	2.63	0.360	0.018	0.001	0.015	0.001	0.035	0.003
NF 270	3.44	0.000	0.019	0.001	0.020	0.001	0.031	0.004
NP 010	2.34	0.000	0.034	0.006	0.042	0.008	0.063	0.017
NP 030	0.55	0.000	0.040	0.006	0.050	0.007	0.069	0.007
DK	4.79	0.000	0.018	0.002	0.017	0.002	0.021	0.002
DL	5.44	0.000	0.019	0.002	0.017	0.002	0.023	0.003
MPS 34	2.40	0.000	0.043	0.004	0.029	0.004	0.059	0.004
MPS 36	1.74	0.000	0.044	0.007	0.026	0.013	0.057	0.014
UTC 60	3.88	0.058	0.025	0.001	0.041	0.002	0.046	0.002

^a in $kg \text{ solute} \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$
^b in $kg \text{ solute} \cdot kg^{-1} \text{ solvent}$

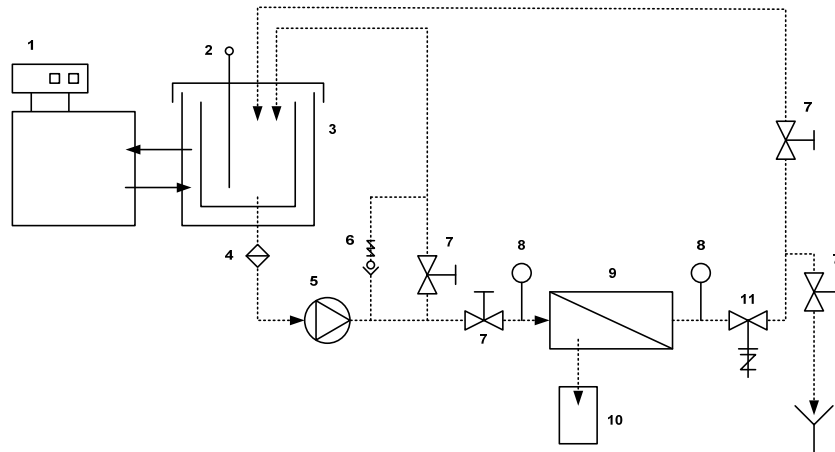


Figure 1. Schematic diagram of the experimental apparatus: 1. thermal bath, 2. temperature probe, 3. feed tank, 4. pre-filter, 5. high-pressure pump, 6. security valve, 7. valves, 8. pressure probes, 9. membrane cell system, 10. balance, 11. pressure control valve

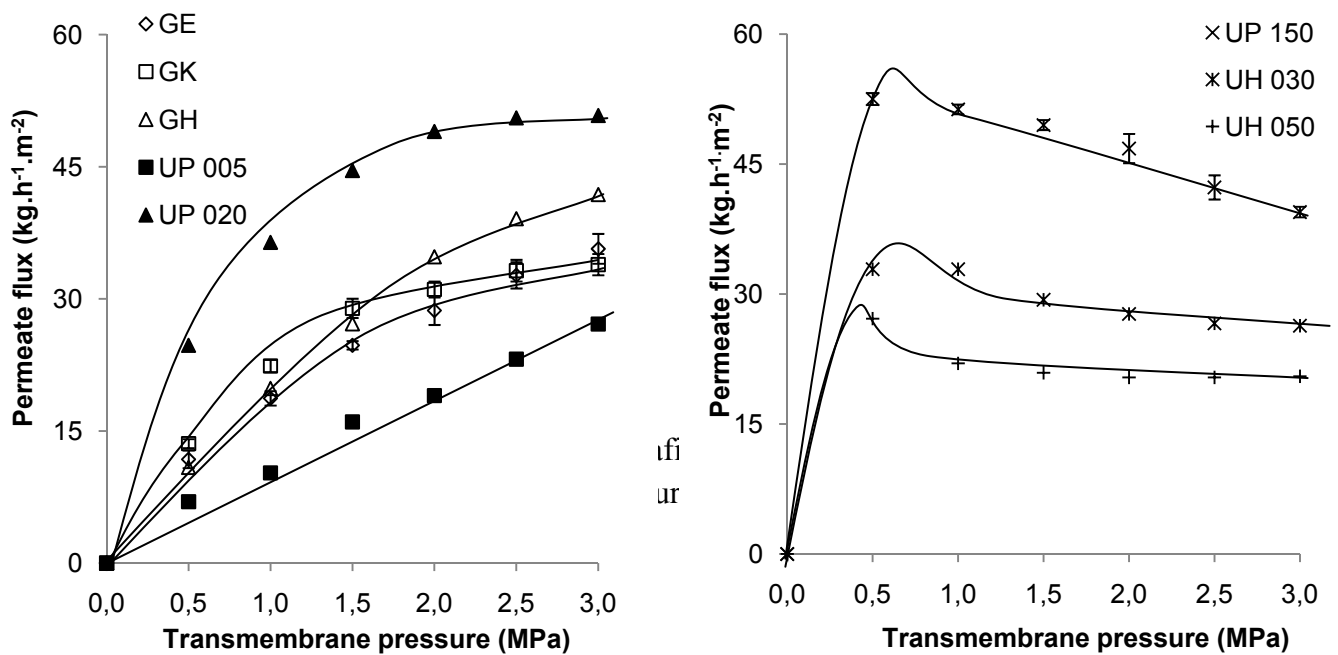
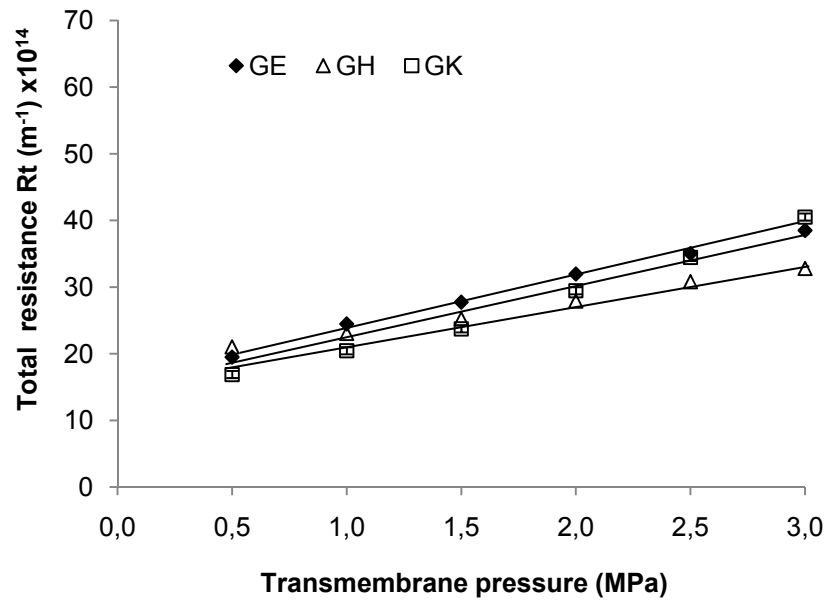


Figure 2. Evolution of permeate flux during ultrafiltration of Roselle extract at constant VRR ($1 < \text{VRR} < 1.1$) according to transmembrane pressure for 8 different membranes (error bars represent standard deviation for $n=3$)



(b)

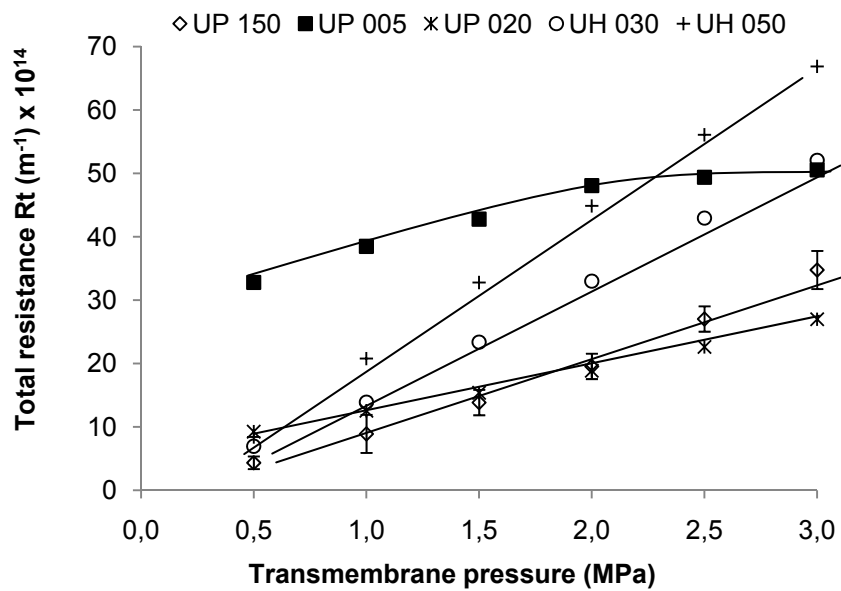


Figure 3. Evolution of total resistance for ultrafiltration membranes tested: (a) GE Osmonics membrane (b) Microdyn Nadir membranes (error bars represent standard deviation for $n=3$)

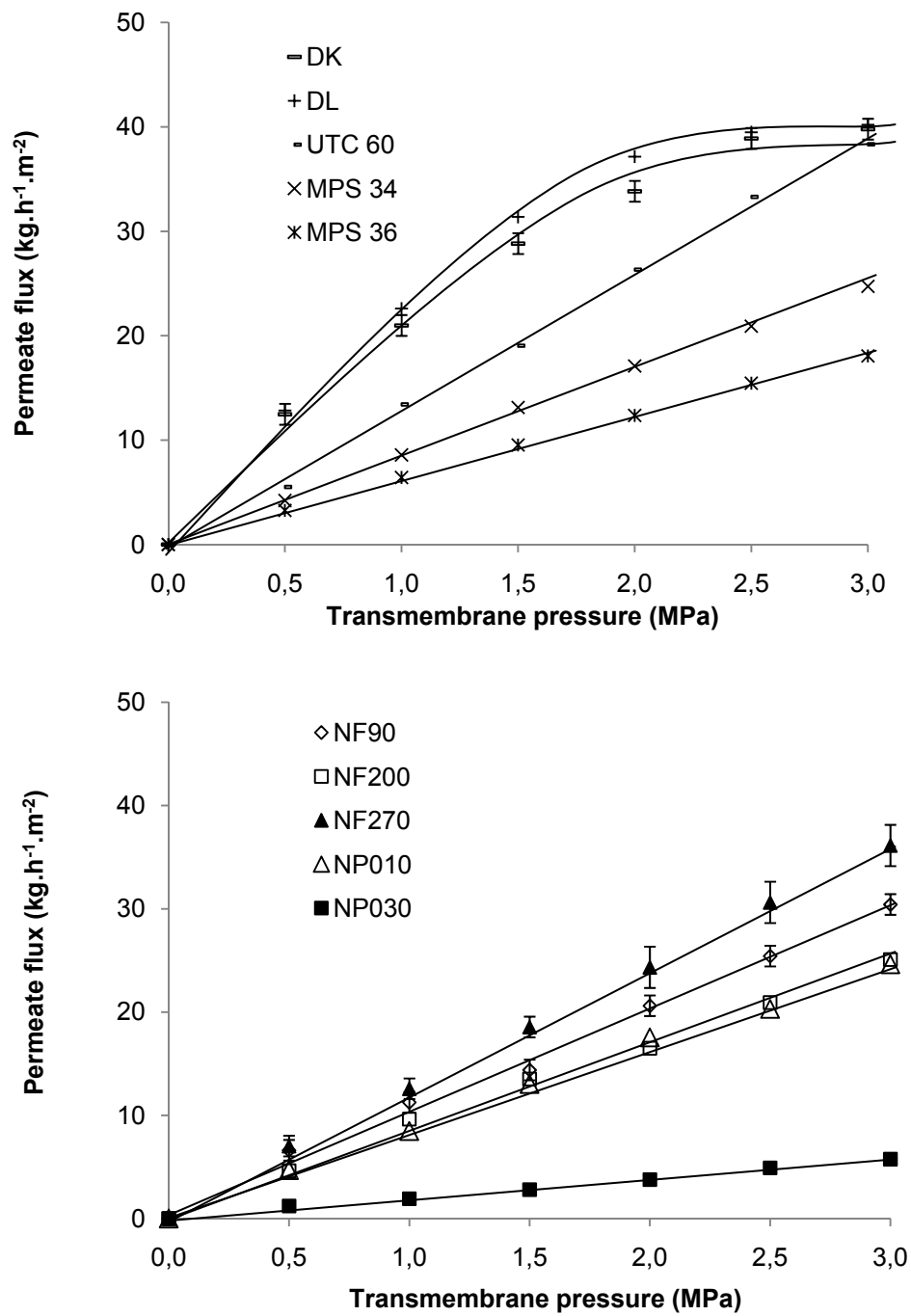


Figure 4. Evolution of permeate flux during nanofiltration of Roselle extract at constant VRR ($1 < \text{VRR} < 1.1$) according to transmembrane pressure for 10 different membranes (error bars represent standard deviation for $n=3$).

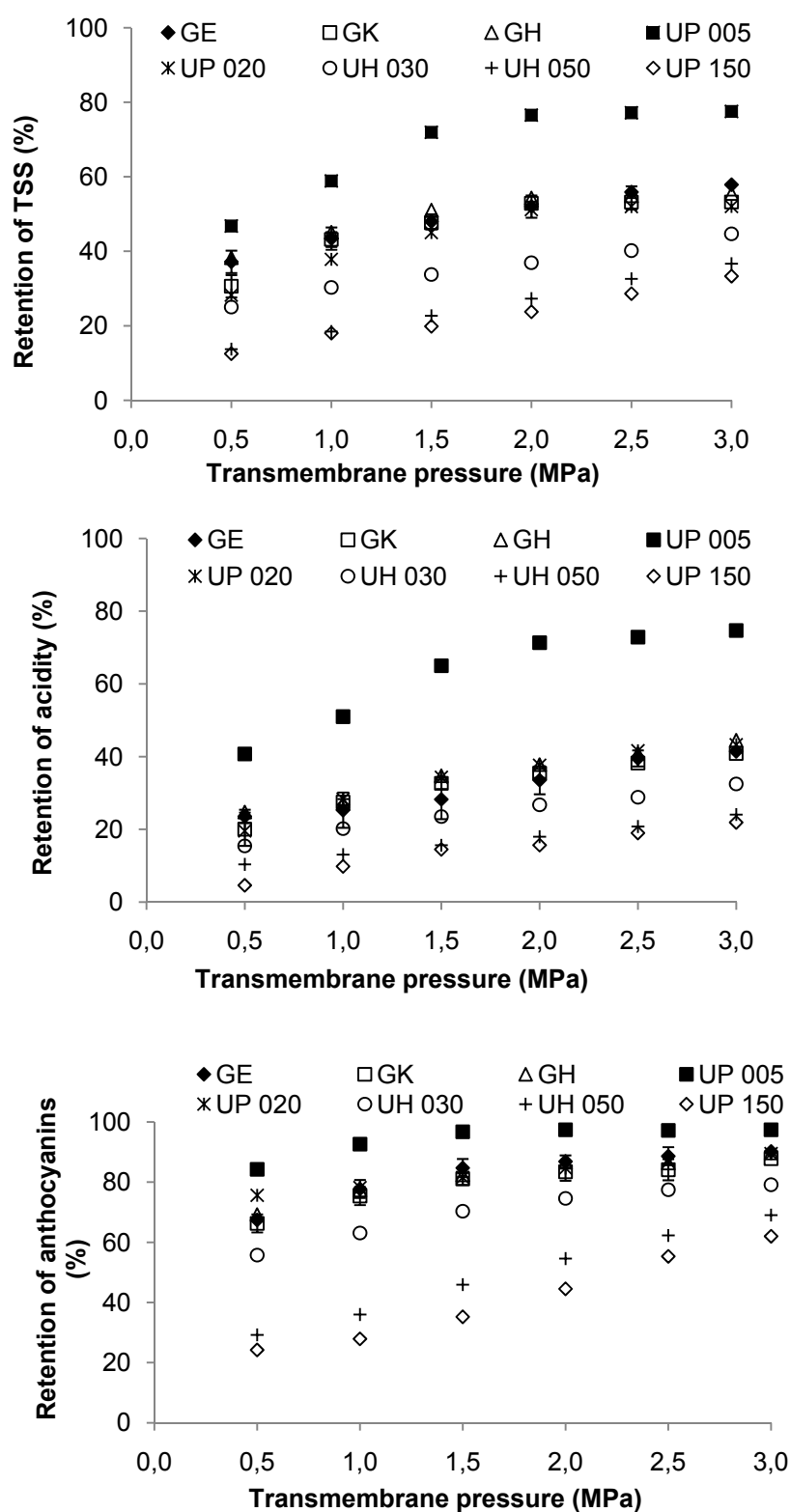


Figure 5. Retention of total soluble solids, titratable acidity and total anthocyanins for ultrafiltration membranes tested (error bars represent standard deviation for n=3)

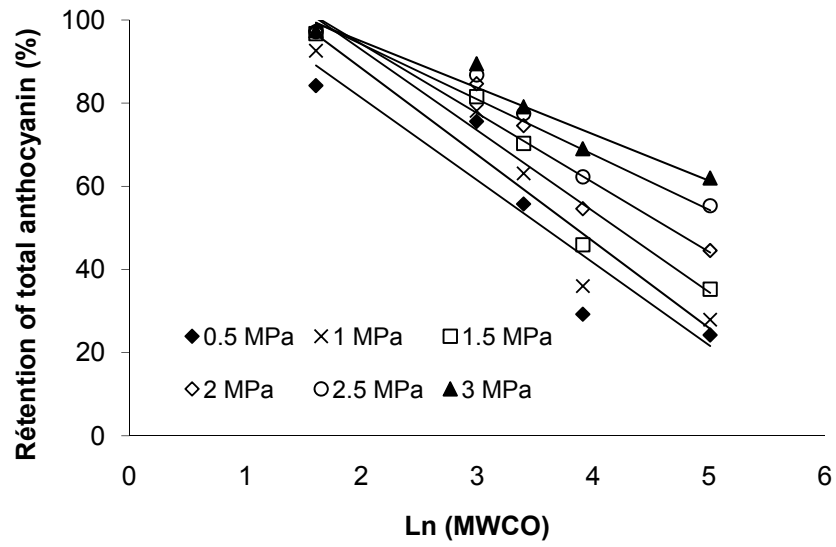


Figure 6. Retention of total anthocyanins for Microdyn-Nadir ultrafiltration membranes tested (a) Retention vs MWCO; (b) Retention vs Ln (MWCO) (error bars represent standard deviation for n=3)

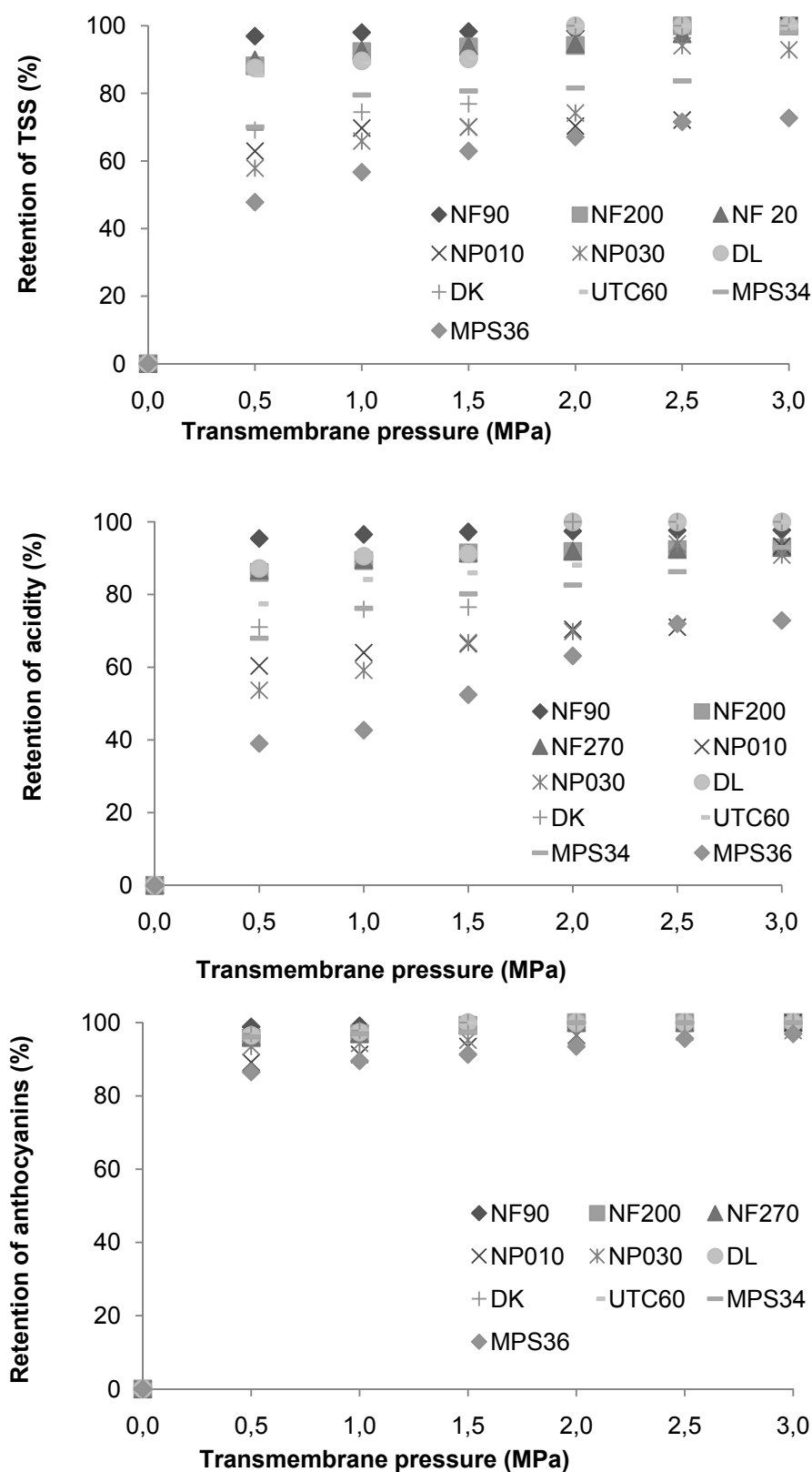


Figure 7. Retention of total soluble solids, titratable acidity and total anthocyanins for nanofiltration membranes tested (error bars represent standard deviation for n=3)

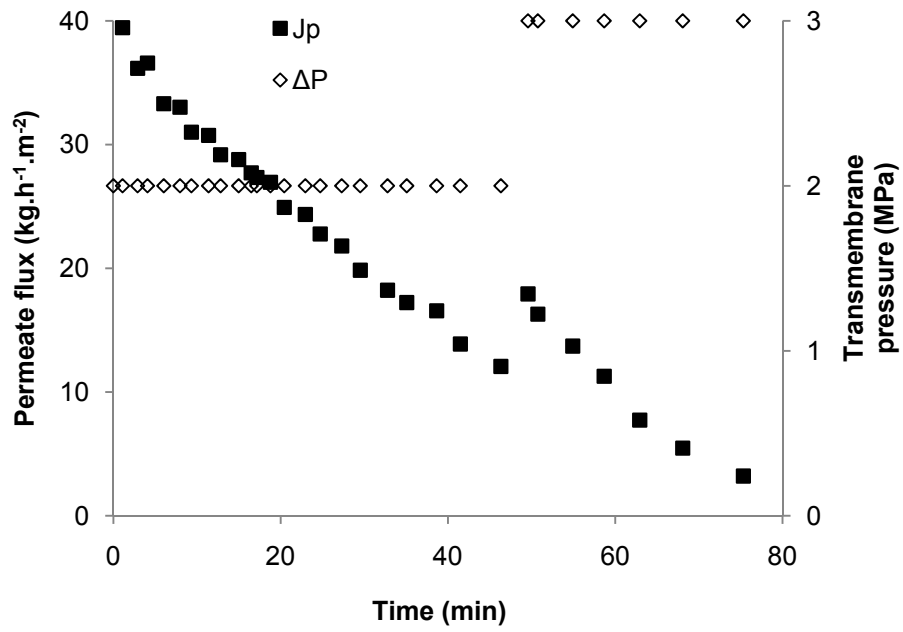


Figure 8. Evolution of permeate flux and transmembrane pressure over time

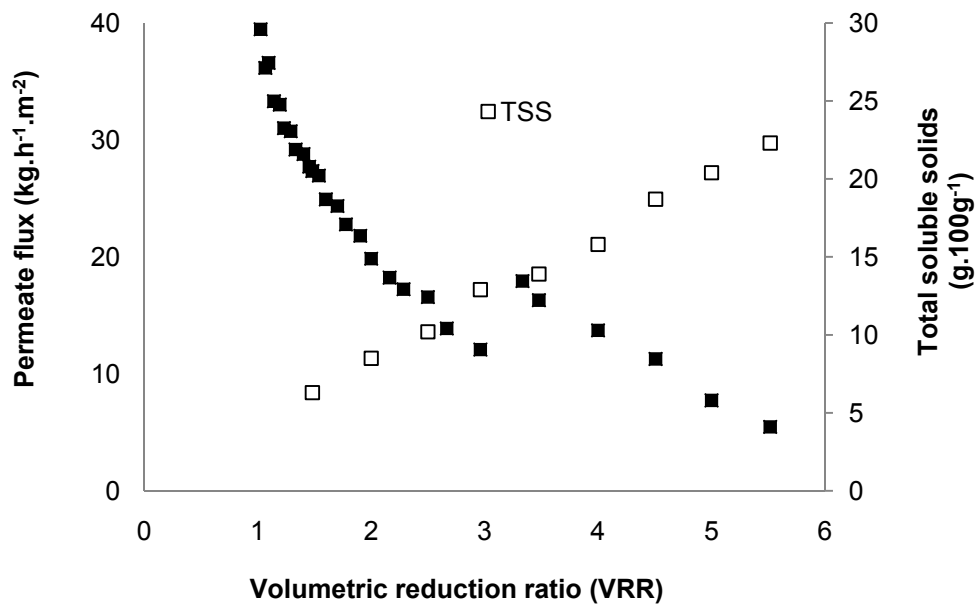


Figure 9, Evolution of permeate flux and total soluble solids over volumetric reduction ratio

5- Concentration par évaporation osmotique

L'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa*, de part sa richesse en anthocyanes, possède des qualités nutritionnelles, sensorielles et des propriétés antioxydantes très intéressantes. L'extrait peut ainsi être utilisé pour la production de boissons et de divers produits. Il peut être une source de colorant naturel pour l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. La concentration de l'extrait par des techniques qui ne dégradent ni les anthocyanes ni la stabilité de l'extrait est un préalable pour cette voie de valorisation. L'évaporation osmotique, technique membranaire de concentration à basses températures (15-45°C) et pression atmosphérique, déjà appliquée sur de nombreux jus de fruits pourrait être une alternative intéressante à la concentration par évaporation sous vide qui est classiquement réalisée en industrie autour de 80 °C.

L'objectif de ce travail est d'évaluer le potentiel de l'évaporation osmotique pour concentrer dans des conditions semi-industrielles, l'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa* sans passer par une étape de clarification. Des jus de pomme et de raisin ont été également concentrés afin de disposer de références (Publication n°8).

Un pilote semi-industriel d'évaporation osmotique développé conjointement par l'entreprise EURODIA et le CIRAD, équipé d'une membrane en polypropylène de 10 m² a été utilisé lors de ces essais. Les essais de caractérisation de l'installation pilote sur eau et solution sucrée ont montré une bonne répétabilité des résultats aussi bien en terme de densité de flux que de conditions opératoires. Des essais réalisés sur l'extrait à 35 et 45 °C ont permis d'obtenir des concentrés à 550 et 620 g.kg⁻¹ d'extrait sec soluble. L'augmentation de la température de 35 à 45 °C a permis d'atteindre un flux évaporatoire moyen de 1.60 kg.h⁻¹.m⁻², soit une augmentation de 25 % par rapport au flux obtenu à 35 °C. Les essais sur jus de pomme et de raisin ont permis d'atteindre des teneurs en extrait sec soluble respectives de 580 et 660 g.kg⁻¹. L'évaluation de la qualité de ces différents concentrés a permis de mettre en évidence que le procédé d'évaporation osmotique maintient l'ensemble des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques, nutritionnelles et aromatiques des produits initiaux. Au contraire, la concentration par évaporation sous vide conduit à des concentrés qui présentent des caractéristiques finales très éloignées des produits frais : pertes en vitamine C, anthocyanes, sucres totaux et composés d'arôme comprises entre 50 et 100 %. L'étude de l'effet des conditions hydrodynamiques sur le flux évaporatoire a permis de proposer un modèle simple permettant de prévoir le flux évaporatoire en fonction du nombre de Reynolds.

Néanmoins, avant toute application industrielle, l'étude de la stabilité des concentrés obtenus est nécessaire. Afin d'évaluer l'impact de cette technologie sur le coût du produit final, une étude technico-économique approfondie devra également être réalisée.

Publication n°8

**Evaluation of the osmotic evaporation at semi industrial scale
to concentrate roselle extract and some fruit juices**

Soumis au Journal of Food Engineering

ATHERMAL CONCENTRATION BY OSMOTIC EVAPORATION OF ROSELLE EXTRACT, APPLE AND GRAPE JUICE AND IMPACT ON QUALITY

**Mady CISSE¹, Fabrice VAILLANT², Sonia BOUQUET³, Dominique PALLET³,
Florence LUTIN⁴, Manuel DORNIER³**

¹ Ecole Supérieure Polytechnique, Université Cheikh Anta Diop, B.P. 5085, Dakar Fann, Sénégal

² Centro de Investigación de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Código Postal 2060, San José, Costa Rica

³ UMR QUALISUD, CIRAD, Montpellier SupAgro, 73 rue J.F. Breton, TA B-95/16, F-34398 Montpellier cedex 5, France

⁴ Eurodia S.A. Wissous 94633 Rungis

ABSTRACT

Osmotic evaporation (OE) also called Osmotic Distillation (OD) was implemented on Roselle extract, apple and grape juices using an industrial pilot plant featured with an hydrophobic polypropylene hollow fibers membrane with a total area of 10.2 m² and an average pore diameter of 0.2 µm. The new equipment developed had good skills for concentration plant extracts and fruit juices with a good control of various parameters such as temperature, flow velocities, concentration of brine. Trials performed allowed achieving total soluble solids content of 660, 570 and 610 g.kg⁻¹ for the grape juice, apple juice, and Roselle extract respectively. Temperature and concentration of solutions significantly influenced the evaporation flux. An average evaporation flux of 1.5 kg.h⁻¹.m⁻² was obtained for Roselle extract during concentration up to 610 g. TSS.kg⁻¹ at 45 °C. The physical-chemical, biochemical and aromatic quality of concentrates were compared to thermal concentrates, and quality was much higher for concentrates obtained by osmotic evaporation and very close to the initial product.

Keywords: osmotic evaporation, concentration, evaporation flux, Hibiscus sabdariffa, grape, apple juice, quality

INTRODUCTION

The preservation during stabilization process, of nutritional, sensorial, antioxidant and pharmaceutical properties of fruit juices and plant extract has become a major challenge in food science and research on technological alternatives to thermal processing has become an important issue. Membrane process such as ultrafiltration, nanofiltration, reverse osmosis and osmotic evaporation are today consolidated systems to concentrate fruit juices and plant extract for their capacity to operate at moderate temperatures and pressures with low energetic consumption and good quality of concentrate (144, 145, 268, 269). The main disadvantage of reverse osmosis is its inability to reach the usual concentration level of standard products produced by thermal evaporation because of limitations due to high osmotic pressure. Studies have shown that the final concentration of fruit juices is limited by membrane and equipment to about 25-30°Brix (156, 269).

Osmotic evaporation (OE) also called osmotic distillation has attracted considerable interest (52, 131, 270) as it allows concentrating juices to as much as 650 g total soluble solids (TSS). kg⁻¹ (141, 142, 156). This process applied to various juices allows better preservation of the quality of raw material (7, 141, 145). However, due to geometrical limitations of membranes and modules commercially available, juices must be clarified previously. To our knowledge, up to now, only few studies on osmotic evaporation process have been conducted at semi-industrial scale (7, 141, 142).

Hibiscus sabdariffa L. is a herbaceous plant cultivated largely in tropical and subtropical area of both hemispheres (178) From the family of Malvaceae, *Hibiscus sabdariffa* is known under different name, such as bissap in Senegal, karkade in North Africa, roselle or sorrel in English, flores de Jamaica in Central and South America. Aqueous extract from calyx of *Hibiscus sabdariffa* presents several interests. It's utilized worldwide in the production of drinks and it is a source of natural food colorants due to the presence of high content of anthocyanins (184, 205). Hibiscus extracts were reported to have many properties like decrease in serum cholesterol in humans and animals (221, 271), protection of liver against oxidative stress (222), antihypertensive and cardioprotective effects (272), attenuation of nephropathy in diabetes (219).

During the classical processing of fruit juices and plant extracts such as thermal pasteurization and concentration by vacuum evaporation, quality of the fresh product undergoes significant changes. Temperatures higher than 50 °C degrade sensorial properties, nutritional compounds such as vitamins, and induce loss of aroma compounds leading to a partial loss of the fresh juice flavor (141, 142, 273). High temperature degrades drastically roselle anthocyanins and reduced anthocyanins stability during storage (184) Cisse et al., 2010.

This work aim to evaluate the potential of using osmotic evaporation to concentrate: roselle extract directly without going through a stage of clarification. Apple and grape juices were also concentrated as reference products. The process is evaluated in terms of performance and impact on product quality compared with the vacuum evaporation.

MATERIALS AND METHODS

Raw materials

To prepare the roselle extract, the dried calyces from Senegal thai variety were mixed with cool demineralized water at a mass ratio of calyx to water of 1:5 during 3 hours. The extract was then successively filtered through a stainless steel sieve (1 mm) and a bag filter system in polyester with 5 μm of micronrating (GAF, Belgium). The extract is then stored at 4 °C until use. Commercial pasteurized apple and grape juices were purchased.

Concentration

An industrial pilot developed by the EURODIA Company (Wissous, France) and CIRAD was used (Figure 1). The pilot plant featured a hydrophobic polypropylene hollow fibers membrane with a total area of 10.2 m² and an average pore diameter of 0.2 μm . The supply tank of juice has a capacity of 50 L while the circuit of brine has a total volume of 70 L. The juice or extract to be concentrated circulated inside the hollow fibers at a tangential velocity between 0.29 and 0.31 m.s⁻¹. The ratio between the effective membrane area and the volume of the concentrate loop is of 523 m⁻¹. The concentrate loop was continuously fed with the roselle extract or the juice and the concentrate was also extracted continuously once the set of total soluble solids was reached. Calcium chloride solution circulated concurrently on the other side of the membrane from 0.26 to 0.45 m s⁻¹. Juice electrical conductivity was always monitored during concentration to ensure membrane integrity and hydrophobicity, and to detect possible salt leakage through the membrane. During the trials, CaCl₂ crystals were added to maintain the brine solution near saturation between 5.5 and 6.0 mol L⁻¹. According to (141) and (7), this configuration allows to better preserve the aroma compounds of the concentrate. The brine temperature was maintained between 37 and 40 °C using a cooling. The extract temperature was regulated by the brine temperature and maintained at 35 ± 2 °C. Pressure and temperature values at the inlet and outlet of the membrane were registered with pressure (± 2%) and temperature gauges (± 1 °C). A maximum difference of 0.5 bar pressure is kept up between the two circuits by adjusting the valve regulating the crossflow velocity of the brine. The average evaporation flux (Jw) was measured on the brine loop. The brine tank has an opening in the upper layer and the water evaporated from the product to concentrate is condensed in the brine resulting in increased volume of brine. The overflow of brine is then collected in a container placed on a balance (Precia Molen, Privas, France) with a maximum capacity of 30 ± 0.01 kg. The mass difference reported by regular time interval (each five minutes) between two successive measurements gives the evaporation flux. At the end of the trials, the dilute brine was recovered and concentrated by heating at atmosphere pressure until the salts crystallized. The crystals were kept for reuse in further trials.

In order to compare osmotic evaporation with a reference process, roselle extract, grape and apple juice were also concentrated by evaporation at 80 °C under a vacuum of 5 kPa using vacuum evaporator with a capacity of 10 liters equipped with a stirrer (Auriol, Marmande-France).

Analyses

All extracts and juices were analyzed for pH, density and dry matter using standard methods (231). Total soluble solid (TSS) was measured using a digital PAL-3 ATAGO refractometer (Japan) with automatic temperature compensation. Total titratable acidity was determined with a TitroLine easy SCHOTT Instruments titrator (Germany), using 0.1 N NaOH. Vitamin C (ascorbic acid and dehydroascorbic acid) was assessed by high-performance liquid chromatography according to (186) using an Agilent 1100 system (Massy, France).

Sucrose, fructose, and glucose were determined using a DIONEX-DX 600 high performance liquid chromatograph fitted with a Carbowax MA-1 column. The eluant was 612.10^{-3} mol sodium hydroxide solution at a concentration of 0.6 mol.L^{-1} and flow rate of 0.4 ml.min^{-1} . After separation, sugars were detected by a Dionex ED50 pulsed amperometric system. The total sugar content corresponded to the sum of the contents of the different carbohydrate compounds detected in the kernel. Before analysed fruit juices and roselle extracts were diluted and filtered on $0.45 \mu\text{m}$ filters.

The total anthocyanin content was assessed by the pH differential method (162). All absorbance readings were made against distilled water, which acted as the control. Spectrophotometric measurements were carried out using Shimadzu spectrophotometers (UV-1605, Kyoto, Japan). Concentrations were expressed as delphinidin 3-xylosylglucoside equivalents for roselle ($\text{MW}=577 \text{ g.mol}^{-1}$). The molar extinction coefficient at pH 1 and 510 nm, used for calculation, was 26000 L/mol cm (184). All of the reagents used were of analytical grade and were purchased from Sigma (L'isle d'Abeau, France). The total phenolic content was determined with Folin-Ciocalteu reagent according to the method optimized by Georgé et al. (161).

Viscosity was measured at 35°C using a Haake VT 550 (Berlin, Germany) viscosimeter fitted with a coaxial cylinder sensor system NV. Activity of water was measured with an Aw-meter AquaLab 4TE (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 35°C . Alcohol insoluble solids (AIS) such as pectins were determined by dispersing a previously weighed homogenous aliquot of retentate into boiling ethanol (80 vol%) (43).

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was performed in accordance with Ou et al (164), using a microplate spectrofluorimeter with 96-well plates made in black polypropylene (165). The ORAC value was expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{mol.g}^{-1} \text{FW}$)

Headspace Solid-Phase Micro-Extraction (HS-SPME) of free volatiles

Juices and extract samples were analysed with a GC Agilent 6890N Series gas chromatograph equipped with a mass spectrometer Agilent MSD 5973N as detector. Free volatiles were adsorbed on SPME fiber in polydiméthylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB, $65 \mu\text{m}$) were desorbed in splitless mode for 3 min in the GC injector at 250°C . Separation was achieved on a DBWAX J&W 122-7032 Agilent fused-silica capillary column (30 m, 0.25 mm inner diameter, $0.25 \mu\text{m}$ film thickness; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The GC oven temperature program consisted of 40°C for 3 min, $40\text{-}170^\circ\text{C}$ at 3°C.min^{-1} , $170\text{-}240^\circ\text{C}$ for $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ and 240°C for 10 min. Helium was used as a carrier gas with a constant column

flow rate of 1 mL.min⁻¹. The transfer line temperature was kept at 280 °C. The mass spectrometer used for the identification of headspace compounds operated in electron ionization mode (EI, internal ionization source; 70 eV) with a scan range from m/z 40-400. Compound identifications were performed using either NIST (2002 version) or Wiley 275 spectra library, spectra data from authentic compounds and comparison of linear retention index with those found in literature. Linear retention indices (IK) were calculated after analysis, under the same chromatographic conditions, of C8-C20 n-alkane series (Supelco, Bellefonte, PA) according to (274) and 4-methyl 1 pentanol from Sigma (Steinheim, Germany).was used as internal standard for quantification. The quantitative assay was performed by comparing the area of analytes peak with those of the internal standard. So the losses for aroma compounds and the aromatic distance (AD) expressed in arbitrary unit (a u) were evaluated using equation 1 and 2.

$$\% \text{ losses} = \frac{(A_f - A_i)}{A_i} * 100 \quad (1)$$

$$AD = \sqrt{\sum (A_i - A_f)^2} \quad (2)$$

where A_i A_f are respectively the area of aroma compounds before and after osmotic evaporation or vacuum evaporation and AD distance with the initial product in a aromatic space of n dimensions

RESULTS AND DISCUSSION

On **Table 1**, are reported the average operating conditions during osmotic evaporation at semi-industrial scale, of water, sucrose solution at 100 g TSS.kg⁻¹, roselle extracts, apple juice and grape extracts, and the resulting final concentration achieved (TSS_f) as well as the average water flux observed. It is worthy to note that the equipment developed allows controlling accurately all operating conditions and consequently, when replicates of trial were done a very high reproducibility of final results even for different products, was achieved.

Due to pilot configuration, brine temperature was maintained at least 2 ° C above the temperature of the solution to concentrate. For all trials, the average evaporation flux ranged between 1.13 and 1.46 kg.h⁻¹.m⁻² and appears to depend only on juice concentration and temperature of the solution to be concentrated.

The first set of experiments was carried at 35±2°C with demineralized water and sucrose solution at 100 g TSS.kg⁻¹ in order to assess the evaporation performance of the pilot plant. On **figure 2** are represented the evaporation flux versus time, obtained on water and sugar solution. Evaporation fluxes fluctuated between 1.40 to 1.50 kg.h⁻¹.m⁻² and 1.11 to 1.41 kg.h⁻¹.m⁻² respectively for water and sugar solution. These evaporation fluxes are on average 7 times smaller than those obtained by Courel and al., (275) during osmotic evaporation at laboratory level with flat thin porous polytetrafluoroethylene membranes, but 50 to 100% higher for trials with the same module and membrane (141, 276). It shows that module and

membranes even though they are manufactured by the same company, mainly for gas filtration, present uneven performance when used in osmotic evaporation trials.

Average water fluxes (J_w) were slightly higher for water than for sucrose solution respectively 1.43 and 1.26 $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ after 60 min of trial which can be evidently attributed to the polarization effect. Actually, for sucrose solution, content in total soluble solids increases from 105 to 538 g TSS.kg^{-1} .

Using similar operating conditions, a Roselle extract was concentrated from 90 to 543 g TSS.kg^{-1} in 10.5 hours. Although, the hold-up volume of the concentrate loop (19.5 L) has been minimized, this long time results from the high ratio between the hold-up volume and the average evaporation flux (around 1.2 $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$). The behaviour of water flux against time can be observed on **figure 3a**. When total soluble solids (TSS) increased, the evaporation flux decreased from 1.30 $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ at low TSS to 1.13 $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ when TSS reached 400 g.kg^{-1} and to 0.78 $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ when TSS reached 543 g.kg^{-1} . In concordance with results reported previously (142, 275), an inflexion point of water flux is observed when concentration level reaches 400 g.kg^{-1} .

During the first part of the trial, water flux decline is slight and could be attributed to a small decrease in brine concentration from 5.7 mol.L^{-1} at TSS of 90 g.kg^{-1} to 5.6 mol.L^{-1} when TSS reached 400 g.kg^{-1} (**Figure 4**). This result shows the relative important influence of the brine's concentration on evaporation flux. Similar result was observed by other authors (142, 275). During the second part of trial (between 400 and 543 g.kg^{-1}), evaporation flux decline more rapidly until reaching a minimum of 0.78 $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ when concentration reached 543 g.kg^{-1} corresponding to a total decrease of flux by 40% if comparing with initial flux value. This result shows the strong influence that concentration level has on the evaporation flux considering the fact that brine concentration remained almost constant at $5.3 \pm 0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ during the last part of the trial. The important decrease of the evaporation flux corresponds to the exponential increase of solution's viscosity as reported on **figure 4** which may raise the resistance to mass transfer in the liquid phase and consequently the polarization effect inducing a lower driving force. Similar results were obtained for sucrose solution, pineapple, citrus, carrot, kiwifruit and camu-camu juice at laboratory scale (143, 145, 155, 156, 275), for passion fruit, orange and melon fruit juice at semi-industrial scale level (7, 141, 142). On the basis of these results, it can be said that at low TSS, as in the case of water, evaporation flux depends mainly on brine concentration and at concentration values higher than 40 g TSS.100g^{-1} , evaporation rates depend predominantly on solution viscosity and consequently on concentration level and temperature. Because evaporation flux appeared to be independent of time, we can assume that no significant membrane fouling occurred during all trials.

Figure 3b shows the results obtained during a similar trial than the previous one, except temperature of Roselle extracts and brine solution have been increased by almost 10°C. It can be observed that evaporation flux increased significantly with respect to previous trial from 1.76 $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ at low TSS to 1.52 $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ when TSS reached 400 g.kg^{-1} and to 1.24 $\text{kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ when TSS reached 610 g.kg^{-1} . Indeed, several authors (131, 270, 275, 277) have shown that for higher temperature than ambient temperature, the performance of the osmotic

evaporation process are significantly enhanced as viscosity is lower, solute diffusivity higher inducing an increasing the driving force. In our case, an increase in temperature by 10 °C resulted in a global increase of water flux by almost 40 %. This increase could have been greater if temperature differential between solution and brine were positive ($T_j > T_b$), but due to equipment limitations, a negative temperature differential was maintained, even though, according to previous works, the evaporation flux may have been increased by a factor two for a positive temperature differential of 12 to 15°C between the extract and the brine (145, 275).

The osmotic evaporation process at 35°C, using the same equipment, was applied to commercial, clarified apple and grape pasteurized juices. **Figure 5** shows the evaporation flux obtained versus time, during concentration of grape and apple juice respectively from 150 to 660 g TSS.kg⁻¹ and 110 to 570 gTSS.kg⁻¹. Similar trend obtained with Roselle extract were also observed with average evaporation fluxes of 1.10 and 1.22 kg.h⁻¹.m⁻² for grape and apple juice respectively.

In order to determine the conditions under which the mass transfer resistance of the boundary layer can be neglected, evaporative fluxes obtained during the different trials with all the solution tested were reported as a function of the Reynolds number calculated taking into account, viscosity of solutions, the flow inside module and the geometry of the hollow fibers (Figure 6). It can be observed that for Reynolds superior to 100, evaporation flux does not increase anymore contrary to what happen for lower Reynolds number. This result indicates that according to our operating conditions and configuration of membranes and module, the main resistance to mass transfer is in the liquid phase for Reynolds below 100 and primarily in the membrane for higher Reynolds. A simple model (**Equation 1**) can be fitted to these results with good correlation coefficient ($r^2=0.928$).

$$J_w = 0.203.Ln(Re) + 0.272 \quad \text{Equation 1}$$

In our specific case, this model can be used to predict osmotic evaporation flux knowing the Reynolds number calculated taking into account among other parameters, temperature and the content of soluble solids in the solution to be concentrated.

Quality of concentrates obtained

On **Table 2** are presented the main physical-chemical properties of, Roselle, apple and grape initial juices, concentrate obtained by osmotic evaporation (OE) and by vacuum evaporation (VE). For all products, pH did not change due to the buffering capacity of fruit juices and roselle extract. The comparison expressed on dry matter basis (g.kg⁻¹ DM) of solute content (sugar, pectins anthocyanins, and polyphénols) shows no significant differences between the initial product and concentrate EO for all juices and roselle extract. However, significant differences were noted between the initial product and the concentrate obtained by vacuum evaporation. For example, in the case of apple juice, total acidity was 20 % lower in the VE

concentrate than in the raw juice. For glucose, contents in the VE concentrate were 51 and 38 % lower than in initial product for grape and roselle respectively. Similar results were observed during thermal concentration of orange, melon and passion fruit juices (6, 7, 142). These decreases in sugar and organic acids content can be explained by several reactions such as inversion of sucrose due to lower acidity and temperature, the acid degradation of hexoses and the oxidation reactions.

Losses of anthocyanins were slight but not significant for the osmotic evaporation concentrate and only 6 % for vacuum concentrate. These values corroborate previous results obtained by Cisse and *al.* (2009) about the thermal degradation of anthocyanins from roselle extract (184). However, it must be taken into consideration that high temperature treatments tend to decrease significantly the stability of anthocyanins during storage (Cisse and *al.*, 2010).

For total phenolic content, losses during thermal concentration were inconsistent. In roselle extract, polyphenols were even higher in the VE concentrate than in initial extract of roselle. This surprising result is probably due to the formation of colored compounds during thermal concentration. Such compounds may interfere contributing to the increase of absorbance during spectrophotometric determination of phenolics as color of juices is often strongly affected by thermal treatments (200, 268). This hypothesis tends to be confirmed by the antioxidant values assessed by the ORAC assay. The VE concentrate present lower ORAC value ($p < 0.05$) than initial juice and osmotic evaporation concentrate (C_{OE}). A real increase in phenolic compounds would have also increased the antioxidant potential. Between C_{OE} and initial products no significant differences were observed in the ORAC values. For initial product, the ORAC value obtained for grape juice and Roselle extract was in agreement with previous work (170, 171, 205). Another difference between concentrates by osmotic evaporation and vacuum evaporation refers to the viscosity. Viscosity of roselle vacuum concentrate (C_{VE}) is two times higher than the osmotic evaporation concentrate (C_{OE}). This could be explained by the gelatinization of pectin in a more acidic medium (pH 2.3). It shows also that polymerization reactions may have been enhanced by higher temperature (80°C).

Consequently, physico-chemical properties of apple juice, grape juice and Roselle extracts were not significantly modified by the osmotic evaporation process while this was not the case for vacuum evaporation process.

Aromatic quality of concentrates

On **table 3-5**, are reported the relative losses of main aroma compounds for Roselle extracts, grape juice and apple juice respectively, during osmotic evaporation and thermal concentration under vacuum. For both process, losses of volatile aroma compounds can be observed nonetheless losses are much lower in the case of osmotic evaporation. The losses of aroma were between 1 and 27 %, 6 and 31 % and 12 and 46 % respectively for Roselle extract grape juice, and apple juice concentrated using osmotic evaporation. Losses were between, 21 to 79 %, 32 to 100 % and 71 and 100 % respectively for Roselle extract grape juice, and apple juice concentrated using vacuum evaporation process. Actually, the losses reported for all aroma compounds were higher in the vacuum evaporation concentrate than in the concentrate obtained by osmotic evaporation whatever the juice or extract tested. Because of very

important losses of aroma compounds, thermal concentration by vacuum evaporation must be coupled with aroma recovery system even though this system is often expensive and partially efficient.

The losses reported in osmotic evaporation were relatively low but significant. Other authors (153) showed a global loss of the volatile components in orange of about 32% and about 39% in passion fruit juices during osmotic evaporation with the same membrane but with a system where brine was reconstituted continuously by thermal evaporation. In our case, losses seem to be less important, nonetheless, for each product, not all the volatiles were affected equally as transmembrane transfer flux were different. In fact, during osmotic evaporation, mass transfer depends on (a) the initial concentration of the compound in the juice, (b) its relative volatility, (c) its diffusivity in liquid phases and, finally, (d) its diffusivity in air entrapped within the membrane pores (124, 276). The transmembrane transfers of aroma compounds depend also significantly on characteristics of aromatic compound, membrane material and operation conditions. For instance, the aromatic “alcohol” class was globally more affected than the other aroma compound classes. Also, on average, aroma compounds of apple juice seems also to be more sensitive to transmembrane transfers than the aroma compounds of grape juice and Roselle extract. Additionally, a part of losses reported during osmotic evaporation process could be also explained by the absorption of aroma compound on the membrane surface as evidenced in previous works (6, 276). Actually, by implementing membrane preconditioning, and saturate membrane adsorption sites, losses of aromas has been drastically reduced (141, 278). Nonetheless, comparing the aromatic distance (AD), it's clear that the osmotic evaporation concentrate is very close to the initial product. While, for the vacuum evaporation concentrate distance with the initial product in the aromatic space are 2 to 4 times greater. Additionally, in the concentrates obtained by vacuum evaporation, the presence of furans and hydroxymethyl furfural was also observed.

CONCLUSION

The new osmotic pilot plant EURODIA/CIRAD featured with a hollow fiber membrane in polypropylene presents good potential for concentration of fruit juices and plant extracts. Roselle extract could be concentrate at temperature between 35 and 45 °C by osmotic evaporation to as much as 535 to 615 g TSS.kg⁻¹ with an average evaporation flux of 1.1 to 1.5 kg.h⁻¹.m⁻². The quality of the concentrate obtained was very similar to the initial roselle extract. The osmotic evaporation did not modify sugar, acid, polyphenols and anthocyanins contents. Despite relative losses of aroma compounds content, the aromatic quality is also preserved. Osmotic evaporation is a technology with an interesting potential that can be used to concentrate at low temperature tropical fruit juices and plant extracts, while maintaining their physical-chemical, biochemical, nutritional and sensorial characteristics. With this industrial pilot and under the operating conditions tested it is possible to predict the evaporation flow according to the Reynolds number. Nevertheless, before industrial application, an economic study is needed to evaluate the impact of this technology on the cost of final product.

TABLES

Table 1. Average operating conditions and water flux of the different trials of osmotic evaporation performed on the industrial pilot plant.
($\Delta T = T_s - T_j$; $\Delta P = P_j - P_s$); () standard deviation of n trials

Product	T_j (°C)	T_s (°C)	ΔT (°C)	P_j (bar)	P_s (bar)	ΔP (bar)	U_j (m.s ⁻¹)	U_s (m.s ⁻¹)	C_s (mol.L ⁻¹)	TSS_i (kg.kg ⁻¹)	TSS_f (kg.kg ⁻¹)	J_w (kg.h ⁻¹ .m ⁻²)
Water (n = 4)	35.05 (0.72)	38.50 (0.71)	3.45 (0.37)	0.26 (0.00)	0.25 (0.01)	0.02 (0.01)	0.31 (0.00)	0.27 (0.01)	5.90 (0.12)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	1.45 0.01
Sucrose solution (n = 3)	34.83 (0.12)	37.37 (0.06)	2.57 (0.12)	0.40 (0.02)	0.37 (0.02)	0.03 (0.01)	0.31 (0.00)	0.31 (0.02)	5.60 (0.00)	10.67 (0.29)	53.90 (1.45)	1.29 (0.02)
Sucrose solution	34.8	37.2	2.4	0.94	0.90	0.04	0.47	0.56	5.6	15.0	65.0	1.26
Roselle extract (n = 2)	37.40 (0.14)	40.20 (0.00)	2.80 (0.14)	0.58 (0.00)	0.54 (0.00)	0.04 (0.00)	0.31 (0.00)	0.44 (0.00)	5.6 (0.00)	9.0 (0.00)	54.8 (0.00)	1.15 (0.00)
Roselle extract	32.1	34.6	2.5	0.50	0.47	0.03	0.31	0.41	5.6	9.0	53.5	1.13
Roselle extract	34.9	38.2	3.3	0.58	0.55	0.03	0.31	0.44	5.6	9.0	55.7	1.16
Roselle extract	44.9	48.2	3.3	0.71	0.69	0.02	0.30	0.46	5.6	9.0	61.5	1.48
Apple juice	35.3	37.9	2.6	0.40	0.38	0.02	0.30	0.36	5.6	11.0	57.0	1.17
Grape extract	35.2	37.5	2.3	0.62	0.59	0.03	0.29	0.45	5.6	15.7	66.00	1.17

Table 2. Comparison of the main characteristics of the initial product and the concentrates obtained by osmotic evaporation (OE) and vacuum evaporation (VE); for a product value with the same letter are not significantly different

	Apple juice			Grape juice			Roselle extract		
	Initial	OE	VE	Initial	OE	VE	Initial	OE	VE
pH	3.3a	3.4 a	3.5 a	3.0	3.0	3.4	2.3	2.4	2.4
Density at 35°C (kg.m ⁻³)	1099a	1266b	1263b	1058	1316	1303	1033	1283	1290
TSS (g.kg ⁻¹)	112a	570b	565c	159	668	682	91	549	560
DM (g.kg ⁻¹)	111a	572b	566c	161	669	683	92	551	561
TA (mEq.kg ⁻¹) (mEq.kg ⁻¹ DM)	63 568a	320 560b	260 459c	74 460a	301 450b	257 387c	505 5489a	3000 5446a	2274 4053b
Glucose (g.kg ⁻¹) (g.kg ⁻¹ DM)	22 201a	112 196a	85 151b	79 491a	327 489a	163 239b	21 232a	123 223a	81 144b
Fructose (g.kg ⁻¹) (g.kg ⁻¹ DM)	68 613a	334 583b	230 406a	83 516a	330 493b	255 373b	16 174a	78 142b	55 98c
Sucrose (g.kg ⁻¹) (g.kg ⁻¹ DM)	19. 171a	96 168a	54 95b	Traces Traces	Traces Traces	Traces Traces	46 500a	248 450b	4 7c
Pectin (g.kg ⁻¹ DM)	0	0	0	0	0	0	473a	466a	464a
Viscosity at 35°C (mPa.s)	1.29a	18.68b	13.68c	1.55a	40.57b	39.85b	1.59a	43.98b	88.81c
Aw at 35 °C	0.988a	0.864b	0.865b	0.982a	0.780b	0.812c	0.990a	0.902b	0.912c
Polyphenols (mg.kg ⁻¹) (g.kg ⁻¹ DM)	368 3.3a	1647 2.88ab	1617 2.86b	1061 6.59a	4322 6.46a	3940 5.76b	2644 28.74a	15756 28.61a	25320 45.13b
Anthocyanins (mg.L ⁻¹) (g.kg ⁻¹ DM)	nd nd	nd nd	nd nd	nd nd	nd nd	nd nd	240 2.61a	1400 2.54a	1380 2.46b
ORAC (μmolTrolox.g ⁻¹) (μmolTrolox.g ⁻¹ DM)	5 44a	25 43a	20 35b	14 85a	55 82a	41 60b	39 424a	230 417a	192 346b

nd : not determined

Table 3. Comparison of different aroma compounds between the initial roselle extract, the concentrate obtained by osmotic evaporation (OE) and concentrated under vacuum (VE) IK_C : calculated IK ; IK_L : Literature IK

	Aroma compounds	R _t (min)	Linear retention		Peak area _i /Peak area _{is}			Loses (%)	
			IK _C	IK _L	Initial	OE	VE	OE	VE
Aldehyde	Hexanal	6.18	1076	1084	8.2 (0.24)	7.0 (0.49)	2.3 (0.05)	15	72
	Heptanal	9.25	1179	1174	2.4 (0.10)	2.3 (0.08)	0.9 (0.05)	4	63
	Octanal	13.04	1283	1280	4.0 (0.08)	4.0 (0.20)	2.4 (0.40)	1	40
	Nonanal	17.16	1387	1385	13.0 (0.29)	12.4 (0.20)	6.3 (0.04)	4	52
	Furfural	19.72	1451	1455	39.7 (1.49)	32.5 (0.64)	12.6 (0.38)	18	68
	Decanal	21.35	1491	1484	4.4 (0.10)	4.3 (0.54)	2.7 (0.24)	2	39
	Benzaldehyde	21.92	1505	1495	4.1 (0.15)	3.8 (0.18)	3.2 (0.25)	7	21
	2,4 dimethyl benzaldehyde	32.56	1788	-	18.7 (0.72)	17.5 (0.79)	7.5 (0.93)	7	60
Alcohols	Octanol	23.95	1557	1553	9.1 (0.20)	6.6 (0.31)	1.9 (0.16)	27	79
	Nonanol	27.84	1659	-	2.0 (0.20)	1.5 (0.07)	0.5 (0.06)	26	76
	Eugenol	44.27		-	6.8 (0.14)	6.4 (0.83)	1.6 (0.54)	6	77
Others	2 Pentyl Furan	10.89	1226	1240	2.5 (0.05)	2.0 (0.12)	1.4 (0.03)	19	45
	Methyl 6 heptadienon 3.5	24.85	1580	-	3.2 (0.07)	2.9 (0.09)	0.9 (0.14)	7	69
	Trans Decene 2 al	26.11	1613	1611	4.7 (0.45)	4.3 (0.27)	2.9 (0.05)	9	39
	Linalyl propionate	29.00	1691	1698	6.6 (0.23)	5.3 (0.53)	2 (0.21)	20	63
Aromatic distance								8.1	32.5

Table 4. Comparison of different aroma compounds between the initial grape juice, the concentrate obtained by osmotic evaporation (OE) and concentrated under vacuum (VE) IK_C : calculated IK ; IK_L : Literature IK

	Aroma compounds	Rt (min)	Linear retention		Peak area _i /Peak area _{is}			Loses (%)	
			IK _C	IK _L	Initial	OE	VE	OE	VE
Aldehyde	Octanal	13.12	1286	1280	2.0 (0.23)	1.8 (0.31)	1.4 (0.14)	12	32
	Nonanal	17.25	1390	1385	7.8 (1.55)	6.1 (0.35)	4.4 (0.34)	22	43
	furfural	19.82	1453	1455	5.3 (0.12)	4.9 (0.05)	3.2 (1.00)	6	39
	2 Phenyl ethanal	26.59	1626	1625	5.1 (0.18)	4.3 (0.04)	2.6 (0.31)	16	48
	2 4 dimethyl benzaldehyde	32.69	1792	-	19.5 (0.29)	14.4 (0.51)	1.3 (0.08)	26	93
Alcohols	Hexanol	15.89	1356	1360	8.9 (0.24)	6.2 (0.22)	0	31	100
	Ethanol	3.57	934	929	19.2 (1.71)	14.9 (0.11)	0	23	100
	2 Phenyl ethanol	36.43	1901	-	3.22 (0.19)	2.9 (0.15)	0	8	100
	3 Methyl 1 Butanol	10.29	1211	1205	7.26 (0.43)	55 (0.16)	0.7 (0.12)	24	90
Others	Linalool	23.60	1549	1537	12.8 (0.17)	10.7 (0.01)	1.2 (0.03)	17	90
	Linalyl propionate	29.11	1693	1698	7.5 (0.21)	5.5 (0.23)	0.8 (0.20)	26	90
Aromatic distance								8.3	32.2

Table 5. Comparison of different aroma compounds between the initial apple juice, the concentrate obtained by osmotic evaporation (OE) and concentrated under vacuum(VE); IK_C : calculated IK ; IK_L : Literature IK

		Linear retention			Peak area _i /Peak area _{is}			Loses (%)	
	Aroma compounds	Rt (min)	IK _C	IK _L	Initial	C _{OE}	C _{VE}	OE	VE
Aldehydes	Hexanal	6.18	1076	1084	17.0 (0.25)	12.8 (0.13)	1.2 (0.11)	25	93
	1 trans 2 hexenal	10.34	1212	1220	9.6 (0.43)	7.5 (0.07)	1.3 (0.16)	21	87
	2,4 Dimethyl benzaldehyde	32.57	1788	-	20.6 (0.97)	18.1 (0.09)	5.9 (0.29)	12	71
Alcohols	Ethanol	3.53	931	929	9.1 (0.41)	5.5 (0.10)	0	40	100
	Hexanol	15.82	1354	1360	183 (6.41)	112 (0.63)	0.3 (0.05)	39	100
	Hex-2-enol	17.87	1405	1407	16.7 (0.48)	10.8 (0.07)	0	36	100
	1 Octanol	23.95	1555	1553	5.1 (0.27)	3.1 (0.06)	0	39	100
	1,2 methyl butanol	10.18	1208	1208	13.7 (0.48)	9.8 (0.15)	0	28	100
Esters	Acetate isoamyl	7.29	1117	1117	19.8 (0.34)	10.6 (0.11)	0	46	100
	Butyl formiate	8.12	1144	-	10.8 (0.36)	8.3 (0.16)	0	24	100
	Butyl acetate	5.98	1067	1075	34.3 (1.08)	23.3 (0.45)	1.1 (0.17)	32	97
	Hexyl acetate	12.50	1269	1270	19.2 (0.04)	12.8 (0.21)	0	33	100
	2 hexenyl acetate	14.87	1330	1327	7.4 (0.13)	5.8 (0.03)	0	22	100
	Ethyl butyrate	5.19	1032	1028	16.8 (0.05)	11.6 (0.11)	0	31	100
	Methyl 1 Ethyl 2 methyl butyrate	5.55	1048	1050	6.6 (0.10)	4.5 (0.07)	0	32	100
	Pentyl methylbutyrate	20.92	1481	1488	5.2 0.25)	4.1 (0.04)	0	21	100
	Ethyl acetate	2.98		-	13.8 (0.27)	10.7 (0.03)	0	22	100
Others	β-Damascenone	33.19	1807	1813	6.5 (0.60)	4.6 (0.09)	0.3 (0.03)	30	95
						Aromatic distance		83	193

FIGURES

Figure 1. Schematic of the pilot plant of osmotic evaporation used for concentration of roselle extract, apple and grape juices

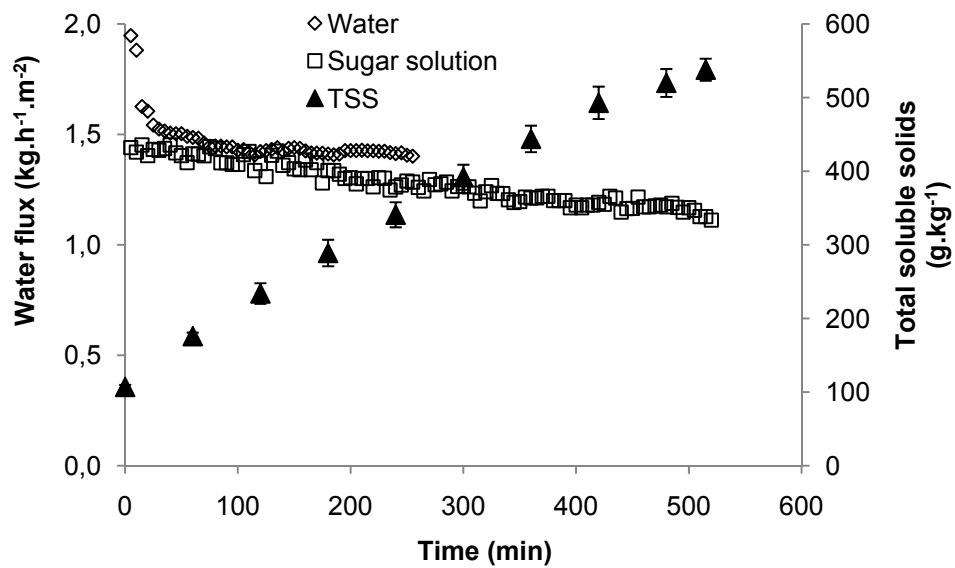


Figure 2. Water flux and concentration in total soluble solids (TSS) during osmotic evaporation of water and sugar solution

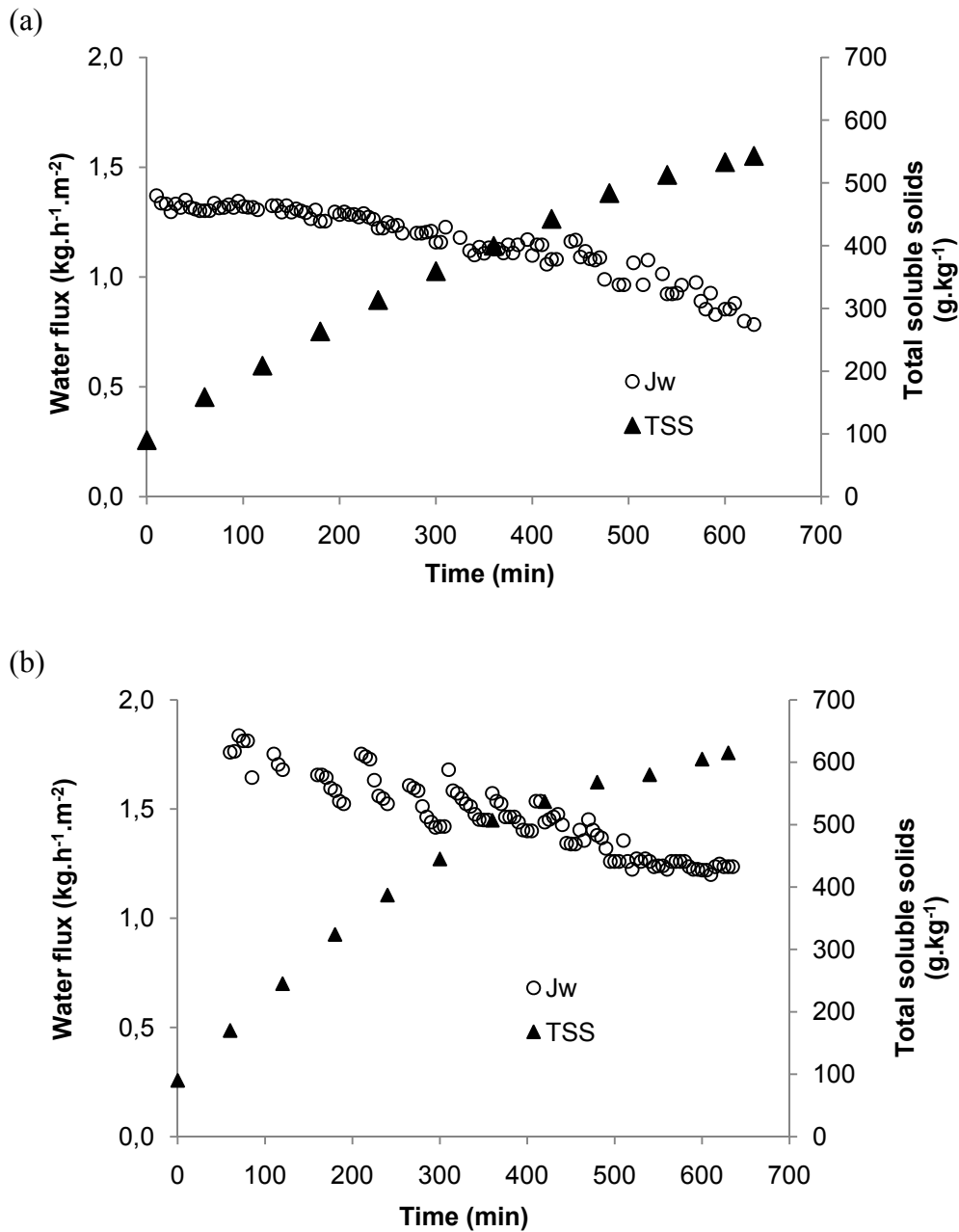


Figure 3. Evolution of water flux and total soluble solids during the osmotic evaporation of the roselle extract (a) $T_j = 34.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_b = 38.2\text{ }^{\circ}\text{C}$; (b) $T_j = 44.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_b = 48.2\text{ }^{\circ}\text{C}$

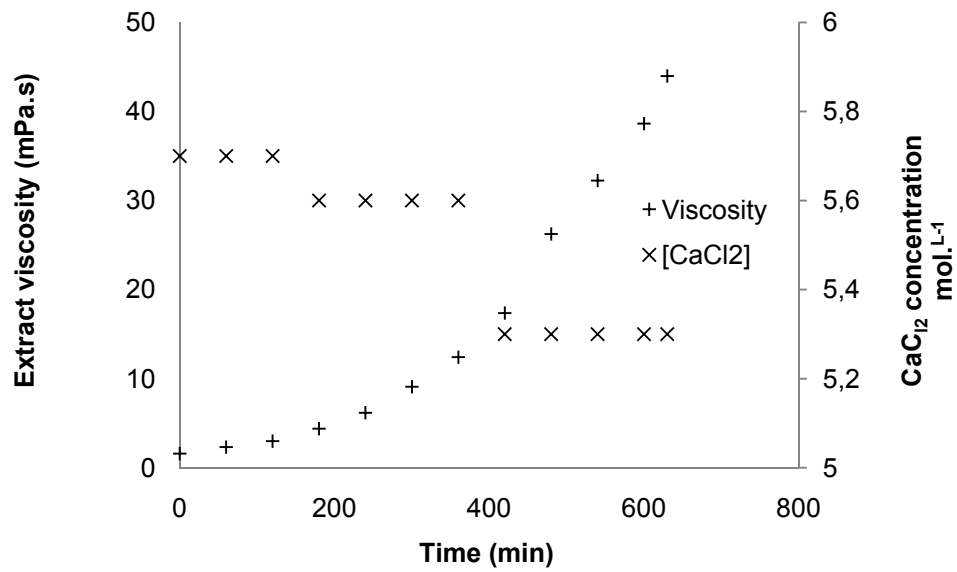


Figure 4. Evolution of brine concentration and extract viscosity during osmotic evaporation of roselle extract at $T_j = 34.9^\circ\text{C}$ and $T_b = 38.2^\circ\text{C}$

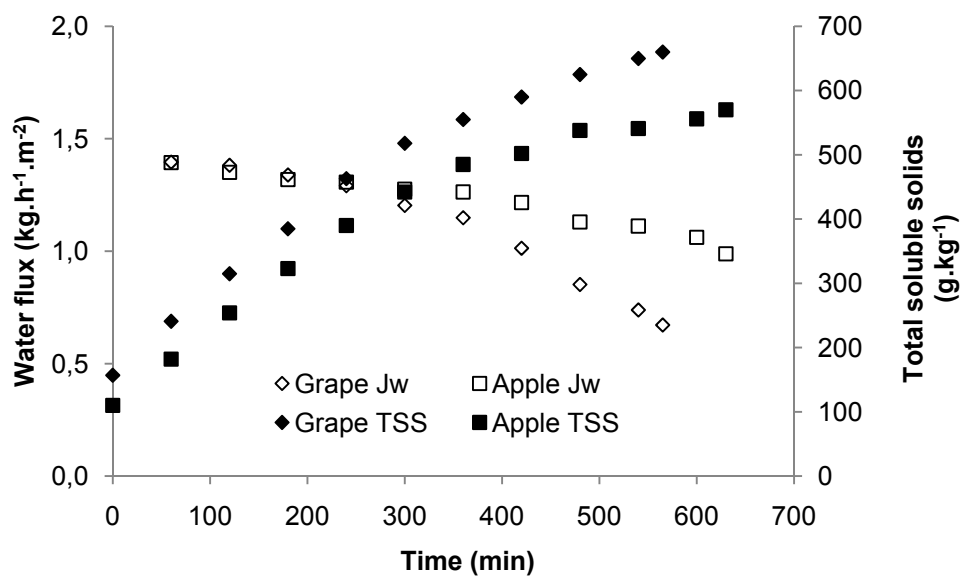


Figure 5. Evolution of water flux and total soluble solids during the osmotic evaporation of apple and grape juice ($T_j = 34 \pm 2^\circ\text{C}$, $T_b = 36 \pm 2^\circ\text{C}$)

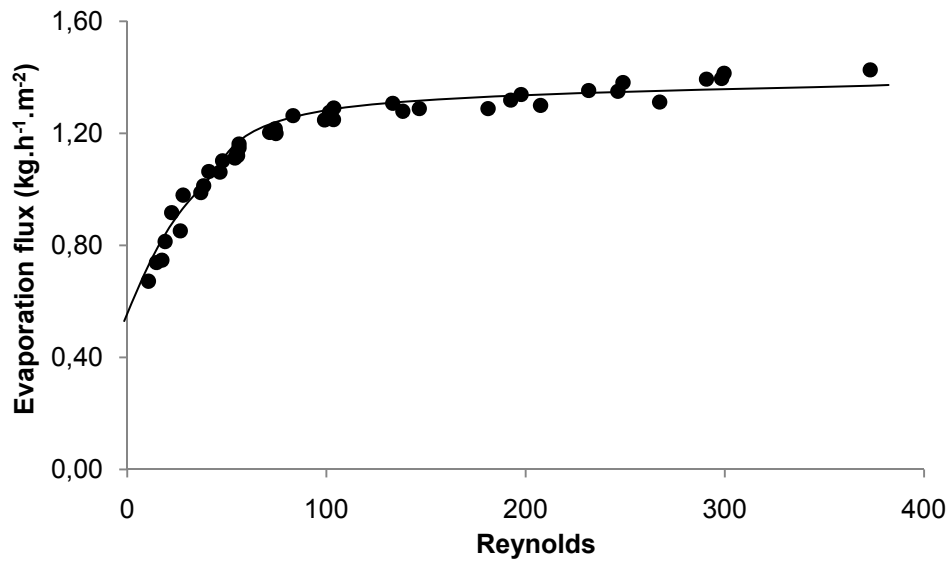


Figure 6. Evaporation flux vs Reynolds number in the hollow fibers of the concentrate loop.

6- Couplage des opérations unitaires

Au cours de ce travail, nous avons étudié successivement cinq opérations unitaires à savoir l'extraction solide-liquide, la microfiltration tangentielle, l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'évaporation osmotique pour obtenir un extrait aqueux à partir des calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Pour chacune de ces opérations, nous avons optimisé les principales conditions opératoires et quantifié leurs performances

L'objectif de cette dernière partie est de rechercher et de comparer les associations d'opérations unitaires possibles pour constituer une ligne de production d'extrait de calices d'*Hibiscus sabdariffa*.

6-1 Les différents couplages

La **figure 1** illustre les différentes possibilités de couplage des cinq opérations unitaires étudiées séparément. Plusieurs produits finaux peuvent être obtenus : un extrait brut (EB), un extrait clarifié et stérilisé à froid (EP), un extrait concentré en anthocyane (EC). Les extraits brut et clarifié peuvent être destinés à la fabrication de boissons rafraîchissantes pour le marché local et régional. L'extrait concentré peut servir de base pour la production de boissons, de cocktails avec d'autres jus de fruits ou de boissons alcoolisées. Il peut aussi être utilisé comme colorant naturel dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

L'extrait brut est obtenu par extraction aqueuse à différents ratio massiques calices/eau et conditions opératoires définis dans le chapitre 2 (Publication n°5). L'extrait clarifié et stérilisé à froid résulte du couplage de l'extraction aqueuse avec la microfiltration tangentielle. En partant de l'extrait brut, 8 possibilités de couplages sont envisageables pour la production d'extrait concentré d'*Hibiscus sabdariffa* (**Tableau 1**).

Cependant, lors des différents essais, la microfiltration tangentielle n'a été utilisée que pour la production d'extrait "stérilisé" à froid. Les essais de nanofiltration et d'évaporation osmotique ont été effectués à partir d'extraits bruts non microfiltrés du fait de l'absence de solides insolubles en suspension et de la faible teneur en solides insolubles dans (Tableau, paragraphe). Les essais d'ultrafiltration ayant été effectués uniquement à FRV 1 (sans concentration), les couplages qui mobilisent l'ultrafiltration ne pourront pas être raisonnablement pris en compte dans la comparaison des différents couplages. Par conséquent, seuls 3 couplages seront retenus. Il s'agit de :

- configuration 1 : Extraction (E) + Nanofiltration (N) + Evaporation osmotique (O) (CP_{ENO})
- configuration 2 : Extraction + Evaporation osmotique (CP_{EO})
- configuration 3 : Extraction + Evaporation osmotique bi-étagée (CP_{EO2})

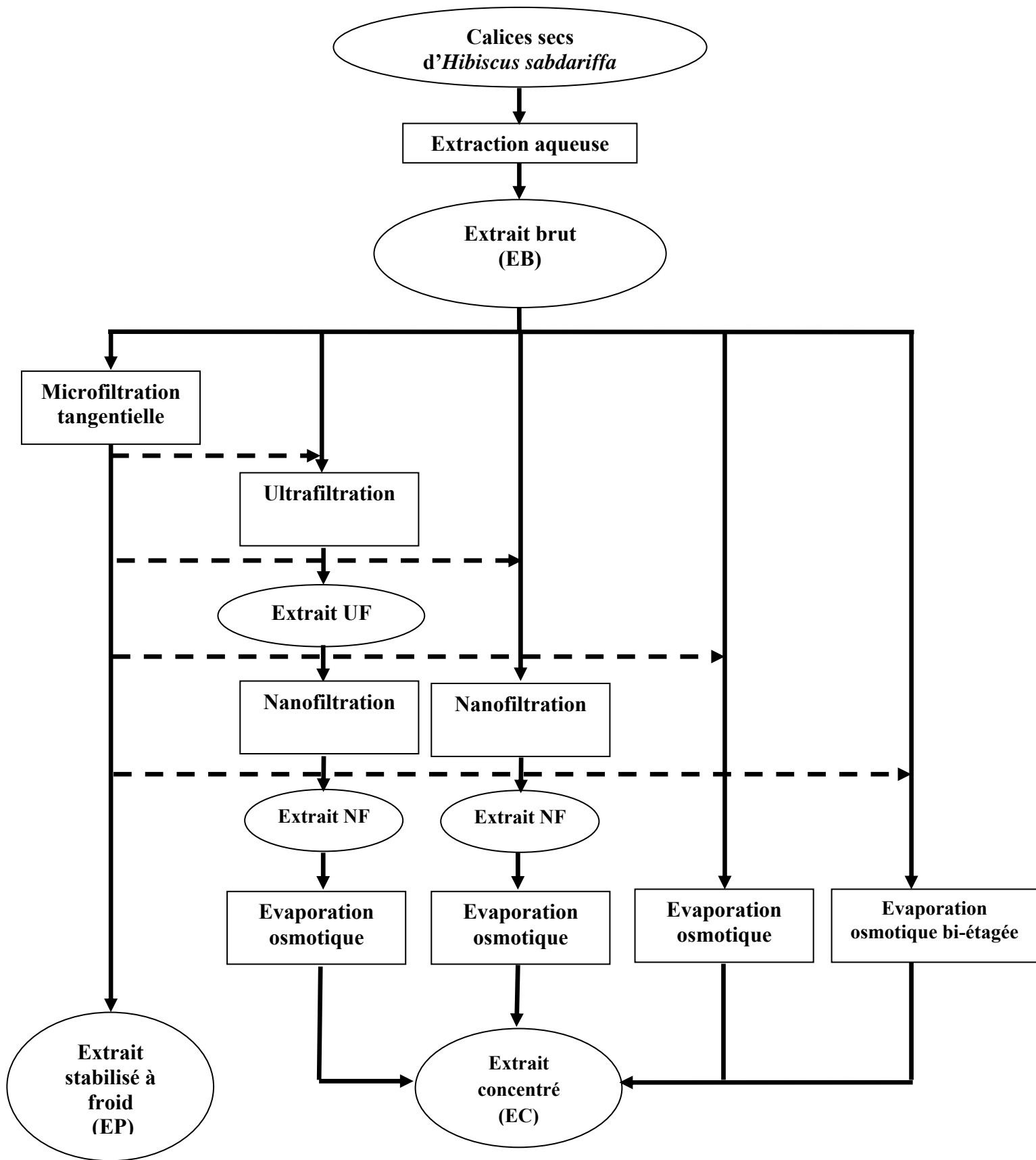


Tableau 1. Couplages d'opérations unitaires possibles en fonction du produit à obtenir.

Produit	Couplage de procédés	Nomenclature
Extrait stérilisé (ES)	Extraction -Microfiltration	CP _{EM}
Extrait concentré (EC)	Extraction-Microfiltration-Ultrafiltration-Nanofiltration-Evaporation osmotique	CP _{EMUNO}
	Extraction-Microfiltration-Nanofiltration-Evaporation osmotique	CP _{EMNO}
	Extraction-Microfiltration-Evaporation osmotique	CP _{EMO}
	Extraction-Microfiltration-Evaporation osmotique étagée	CP _{EMEO2}
	Extraction-Ultrafiltration-Nanofiltration-Evaporation osmotique	CP _{EUNO}
	Extraction- Nanofiltration-Evaporation osmotique	CP _{ENO}
	Extraction- Evaporation osmotique	CP _{EO}
	Extraction- Evaporation osmotique étagée	CP _{EO2}

Au niveau de l'extraction, l'impact du ratio massique calices/eau sera pris en considération. Nous le ferons varier de 1/25 à 1/2. Par contre, il n'est pas envisagé de réaliser l'extraction à chaud compte-tenu de la moins bonne stabilité de l'extrait lorsqu'il est chauffé (cf. paragraphe (cf.§ 3 étude stabilité). La température d'extraction sera donc fixée à 35 °C. La taille des fragments de calices utilisés pour l'extraction est fixée à 150 µm conformément aux résultats présentés dans le paragraphe (cf. § 4 optimisation de l'extraction) Les différents calculs se basent sur un bilan matière qui est réalisé pour chaque couplage sur la base de 100 kg de calices secs. Les **figures 2** et **3** présentent à titre d'exemples les 3 couplages étudiés et les bilans matière correspondants pour une extraction réalisée avec un ratio calices/eau de 1/5. Pour le couplage CP_{ENO}, l'effet de la teneur en extrait sec soluble de transition entre la nanofiltration à l'évaporation osmotique a été également évalué pour un ratio calices/eau de 1/5.

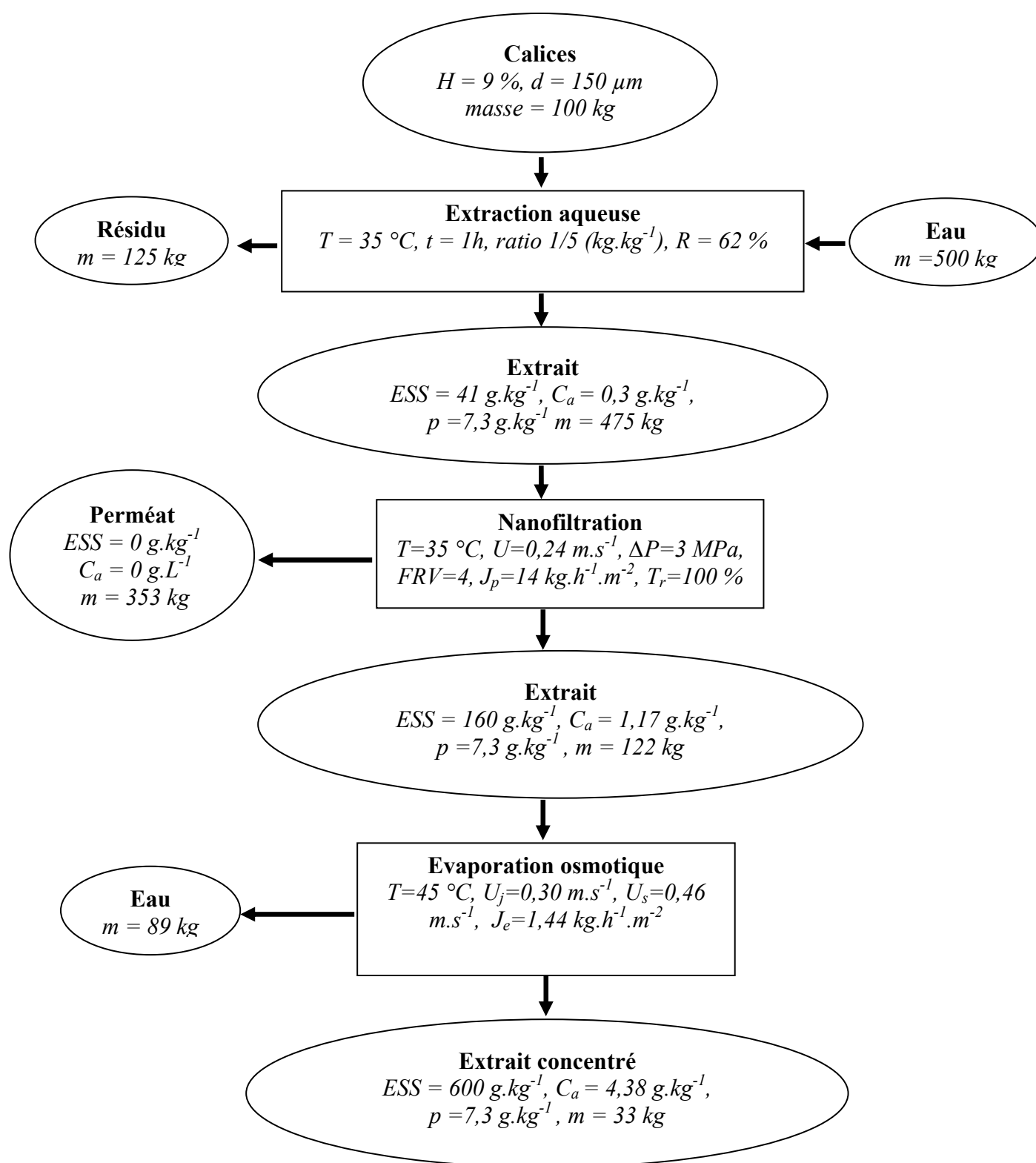


Figure 2. Couplage des procédés d'extraction de nanofiltration et d'évaporation osmotique (CP_{ENO}) pour la production d'extrait anthocyanique concentré sur la base de 100 kg de calices à partir d'un ratio d'extraction calices/eau de 1/5 (H humidité des calices secs ; d diamètre des fragments de calices ; R rendement d'extraction des anthocyanes ; C_a et p concentration et pureté en anthocyanes).

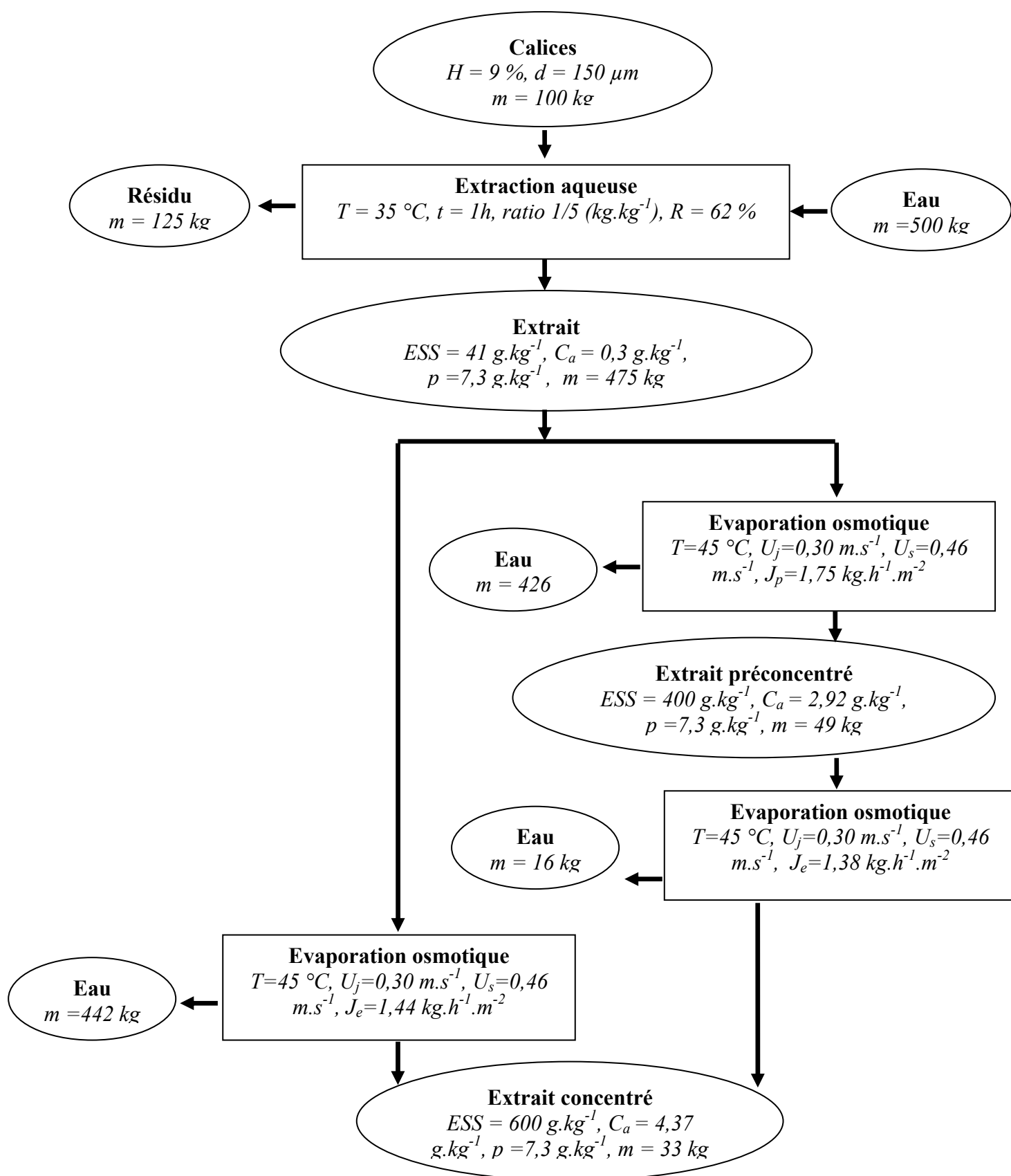


Figure 3. Couplages des procédés d'extraction et d'évaporation osmotique (CP_{EO}, CP_{EO2}) pour la production d'extrait anthocyanique concentré sur la base de 100 kg de calices à partir d'un ratio d'extraction calices/eau de 1/5.

6-2- Méthodes d'évaluation des coûts

L'objectif de cette évaluation n'est pas d'obtenir des chiffres exacts qui intègrent de manière exhaustive l'ensemble des coûts. Il s'agit plutôt ici de disposer des principaux éléments de comparaison entre les diverses variantes afin de permettre d'orienter les choix. Les coûts seront donc évalués de façon simplifiée en ne considérant que les procédés membranaires. Seuls les postes principaux de dépense seront pris en compte pour le fonctionnement.

Pour comparer les différents couplages les hypothèses suivantes sont retenues :

- La matière première se constitue de 100 kg de calices séchés d'*Hibiscus sabdariffa*.
- L'extrait sec soluble (ESS) du concentré final est de 600 g.kg⁻¹ conformément aux exigences du marché des concentrés de jus de fruits.
- La durée de chaque opération unitaire est de 8 h.
- Le rendement des pompes est de 80 %.
- Les coûts du chlorure de calcium et de l'électricité sont de 0,8 €.kg⁻¹ et de 0,0357 €.(kWh)⁻¹.
- La régénération de la saumure est effectuée par évaporation de l'eau à pression atmosphérique (100 °C).
- Les coûts d'investissement et de fonctionnement des procédés membranaires sont proportionnels à la surface membranaire installée.

Pour l'évaluation économique, les données de base découlent des résultats expérimentaux obtenus au cours des différents essais de nanofiltration et d'évaporation osmotique réalisés sur les pilotes semi-industriels (**Tableau 2**).

Tableau 2. Quelques données de base pour l'évaluation des coûts.

	Nanofiltration			Evaporation osmotique
	FRV 2	FRV 3	FRV 4	
Jp (kg.h⁻¹.m⁻²)	20	12	14	1,44
ΔP (bar)	20	20	30	0,70
ESS_{final} (g.kg⁻¹)	90	130	160	600
Surface d'1 module (m²)	2,5			10

6-2-1- Détermination de la surface membranaire

Pour chaque procédé membranaire, l'équation (1) permet d'évaluer la surface membranaire A (m²) à partir de la densité de flux J exprimée en kg.h⁻¹.m⁻², la masse d'extrait à traiter m_E (kg) et la durée de l'opération t (h).

$$A = \frac{m_E}{J \times t} \quad (1)$$

6-2-2- Evaluation des coûts de fonctionnement

Nous considérerons, pour évaluer les coûts de fonctionnement, uniquement la consommation énergétique des pompes et le coût de régénération de la saumure utilisée en évaporation osmotique.

Pour déterminer le coût de fonctionnement des pompes, la puissance électrique consommée par les pompes par unité de surface membranaire est évaluée en utilisant l'équation (2).

$$w = \frac{\Delta P \cdot Q_E}{\eta_a \cdot A} \quad (2)$$

avec W la puissance consommée par les pompes ramenée à une unité de surface membranaire en $W.m^{-2}$, ΔP la pression transmembranaire appliquée exprimée en Pa, Q_E le débit de circulation du produit à traiter en $m^3.s^{-1}$ et η_a le rendement de la pompe.

L'énergie consommée par unité de surface membranaire E_m exprimée en $kWh.m^{-2}$ sera alors déterminée grâce à l'équation (3).

$$E_m = \frac{W \cdot t}{1000} \quad (3)$$

Après chaque essai d'évaporation osmotique, toute l'eau extraite du produit à concentrer est évaporée de la saumure pour récupérer le chlorure de calcium qui sera utilisé durant les cycles de concentration ultérieurs. Cette régénération est effectuée par évaporation à pression atmosphérique. La quantité d'énergie nécessaire Q (kJ) pour évaporer la masse d'eau m_e (kg) peut être calculée à partir de l'équation (4).

$$Q = m_e C_{pe} \Delta T + m_e \Delta H_v \quad (4)$$

avec C_{pe} ($kJ.kg^{-1}.C^{-1}$) la chaleur spécifique de la saumure, ΔT la différence entre la température d'évaporation et la température initiale de l'eau et ΔH_v ($kJ.kg^{-1}$) l'enthalpie de vaporisation de l'eau à 100 °C. En première approximation, les caractéristiques de la saumure sont confondues avec celles de l'eau soit :

$$\begin{aligned} \Delta H_v &= 2257 \text{ kJ.kg}^{-1} \\ C_{pe} &= 4,18 \text{ kJ.kg}^{-1} \end{aligned}$$

L'énergie consommée par la régénération de la saumure E_R exprimée en kWh est alors calculée via l'équation (5).

$$E_R = \frac{Q}{3600} \quad (5)$$

6-2-3-Evaluation des coûts d'investissements

Nous considérerons que la quantité initiale de chlorure de calcium fait partie de l'investissement en évaporation osmotique (recyclage total du CaCl_2 par régénération par évaporation à pression atmosphérique). Le volume du circuit saumure est fixé à 60 L. Dans ce cas, le volume final de saumure V_{sf} (L) peut être évalué à l'aide de l'équation (6).

$$V_{sf} = V_e + 60 \quad (6)$$

Avec V_e le volume d'eau évaporée (L).

En considérant que la concentration de la saumure doit être maintenue à 6 mol.L^{-1} durant tout le processus et que le chlorure de calcium présente une pureté de 95 % ($\text{MM} = 110 \text{ g.mol}^{-1}$), la masse de CaCl_2 à mettre en œuvre (kg) est donnée par l'équation (7).

$$m_{\text{CaCl}_2} = \frac{V_{sf} \times 6 \times 110}{950} \quad (7)$$

Les informations concernant les coûts d'investissements des installations de nanofiltration et d'évaporation osmotique ont été difficiles à obtenir et peuvent être sans doute affinées. Les valeurs utilisées dans les calculs sont présentées dans le **tableau 3**.

Tableau 3. Eléments des coûts d'investissement des procédés membranaires utilisés.

Procédés	Coût investissement de l'installation ($\text{€}.\text{m}^{-2}$)	Coût membrane seule ($\text{€}.\text{m}^{-2}$)	Durée de vie approximative pour une utilisation industrielle (année)
Nanofiltration	2000	150	2
Evaporation osmotique	6000	500	5

6-3- Résultats

6-3-1- Sélection d'un couplage de procédés

L'étude de l'optimisation de l'extraction aqueuse des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* a montré que le ratio massique calice/eau de 1/5 permet d'obtenir un bon compromis entre le rendement d'extraction et la concentration en anthocyane. Il peut donc être utilisé comme référence pour comparer les coûts d'investissement et de fonctionnement des trois combinaisons d'opérations unitaires retenues : CP_{ENO} , CP_{O} et CP_{O_2} . Les coûts d'investissement et de fonctionnement des trois couplages sont comparés sur la **figure 4**.

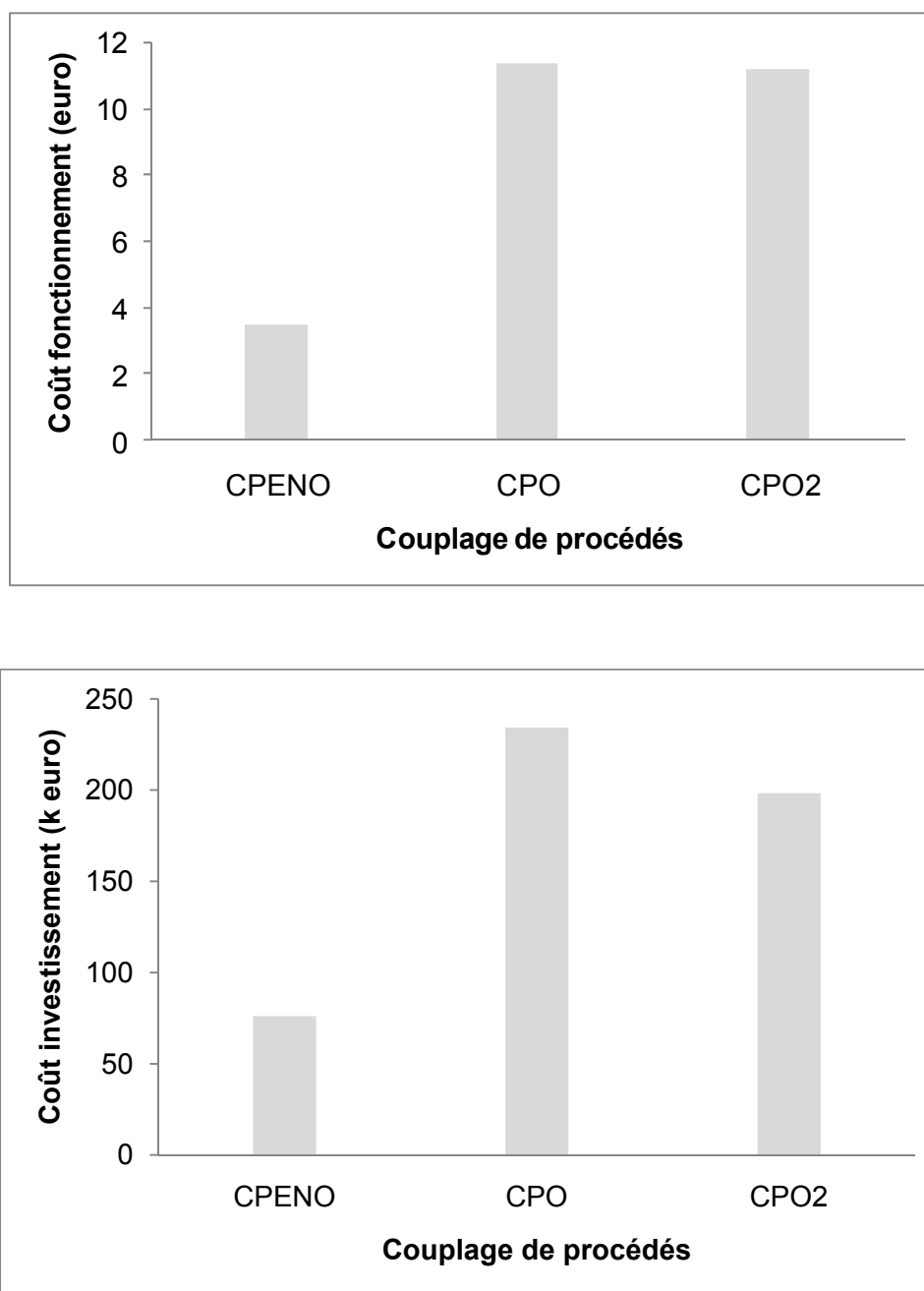


Figure 4. Coûts de fonctionnement et d'investissement pour différents couplages d'opérations unitaires destinés à la production d'un extrait anthocyanique concentré à 600 g.ESS kg⁻¹ à partir d'une extraction réalisée avec un ratio massique calices/eau de 1/5.

Le couplage CP_{ENO}, avec des valeurs de 3,5 € et 76 k€ respectivement pour les coûts de fonctionnement (CF) et les coûts d'investissement (CI), est de loin la combinaison d'opérations unitaires la plus intéressante économiquement. Elle est 3 fois moins chère que les couplages CP_{EO} et CP_{EO2} qui présentent pratiquement les mêmes CF. Cependant le couplage CP_{EO} a un CI de 18 % plus élevé que le couplage CP_{EO2} qui comporte pourtant deux installations contigües d'évaporation osmotique. Ceci est lié à la diminution de la surface membranaire totale installée qui passe de 39 m² pour le couplage CP_{EO} à 33 m² pour le

couplage bi-étagé CP_{EO2} (**Tableau 4**). Au niveau du CF, le coût de régénération de la saumure par évaporation thermique, représente au moins 95 %. Un système de régénération moins onéreux permettrait de rendre les deux couplages incluant l'évaporation osmotique beaucoup plus compétitifs en termes de coûts de fonctionnement. Compte-tenu de ces éléments, le couplage CP_{ENO} sera retenu pour évaluer l'effet du ratio calices/eau utilisé lors de l'extraction sur les coûts et sur la qualité du produit fini.

Tableau 4. Surfaces membranaires calculées en fonction des couplages pour le ratio massique d'extraction calice/eau 1/5 avec une teneur en extrait sec soluble de 160 g.kg^{-1} en finnanofiltration

	CP_{ENO}	CP_O	CP_{O2}
Nanofiltration	5	0	0
Evaporation osmotique étage 1	11	39	31
Evaporation osmotique étage 2	0	0	2
Total	16	39	33

6-3-2- Influence du ratio calice/eau sur la qualité du produit et les coûts

La **figure 5** montre que la pureté et la concentration en anthocyanes augmentent avec l'augmentation du ratio calices/eau. Ces 2 grandeurs semblent tendre vers un maximum à partir d'un ratio calices/eau supérieur ou égal à $\frac{1}{2}$, tandis que la quantité de concentré obtenu chute lorsque le ratio augmente. Un compromis doit donc être trouvé entre la quantité de concentré produite et sa qualité (concentration et pureté en anthocyanes). Le produit à fabriquer, ses utilisations ultérieures, ses conditions de stockage et le coût de production sont des éléments essentiels à considérer dans le choix du ratio.

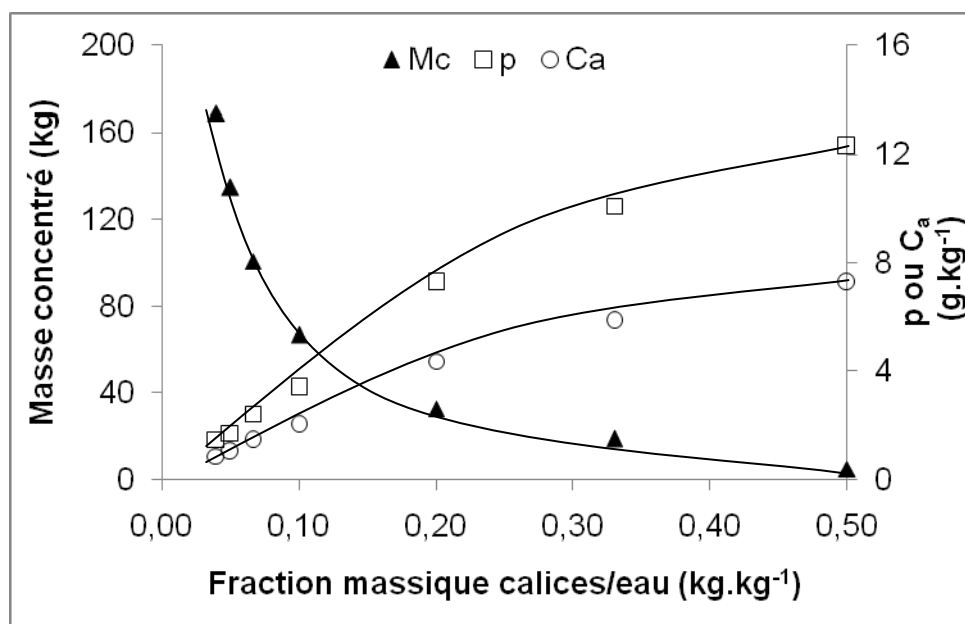


Figure 5. Influence de la fraction massique calices/eau utilisé lors de l'extraction sur la qualité du concentré (Ca et p concentration et pureté en anthocyanes) et la masse finale de concentré à 600 g.kg⁻¹ d'extrait sec soluble (Mc) pour le couplage de procédés CP_{ENO}.

L'analyse de la **figure 6** montre que les coûts de fonctionnement et d'investissement sont moindres aux fractions massiques calices/eau élevées. Ces fractions massiques élevées permettent également d'obtenir des concentrés de meilleures qualités. Néanmoins, dans ces conditions, le rendement de production est faible. Ceci se traduit par une augmentation aux ratios calices/eau les plus élevés du coût de fonctionnement ou d'investissement pour produire 1 kg de concentré comme l'illustre la **figure 7**. Cette configuration peut donc être intéressante dans le cas de petites unités de production qui travaillent à partir d'une matière première disponible en grande quantité à moindre coût et générant un produit fini à haute valeur ajoutée. Les deux premières conditions de disponibilité et de faible coût sont remplies au Sénégal. Les cinétiques de dégradation des anthocyanes au cours du stockage de 4 à 45 °C à partir de différents extraits, montrent qu'à des températures de 4 et 20 °C, une durée de conservation de 2 mois peut être obtenue. La production d'un extrait anthocyanique avec des applications comme colorant alimentaire permettrait de remplir la troisième condition.

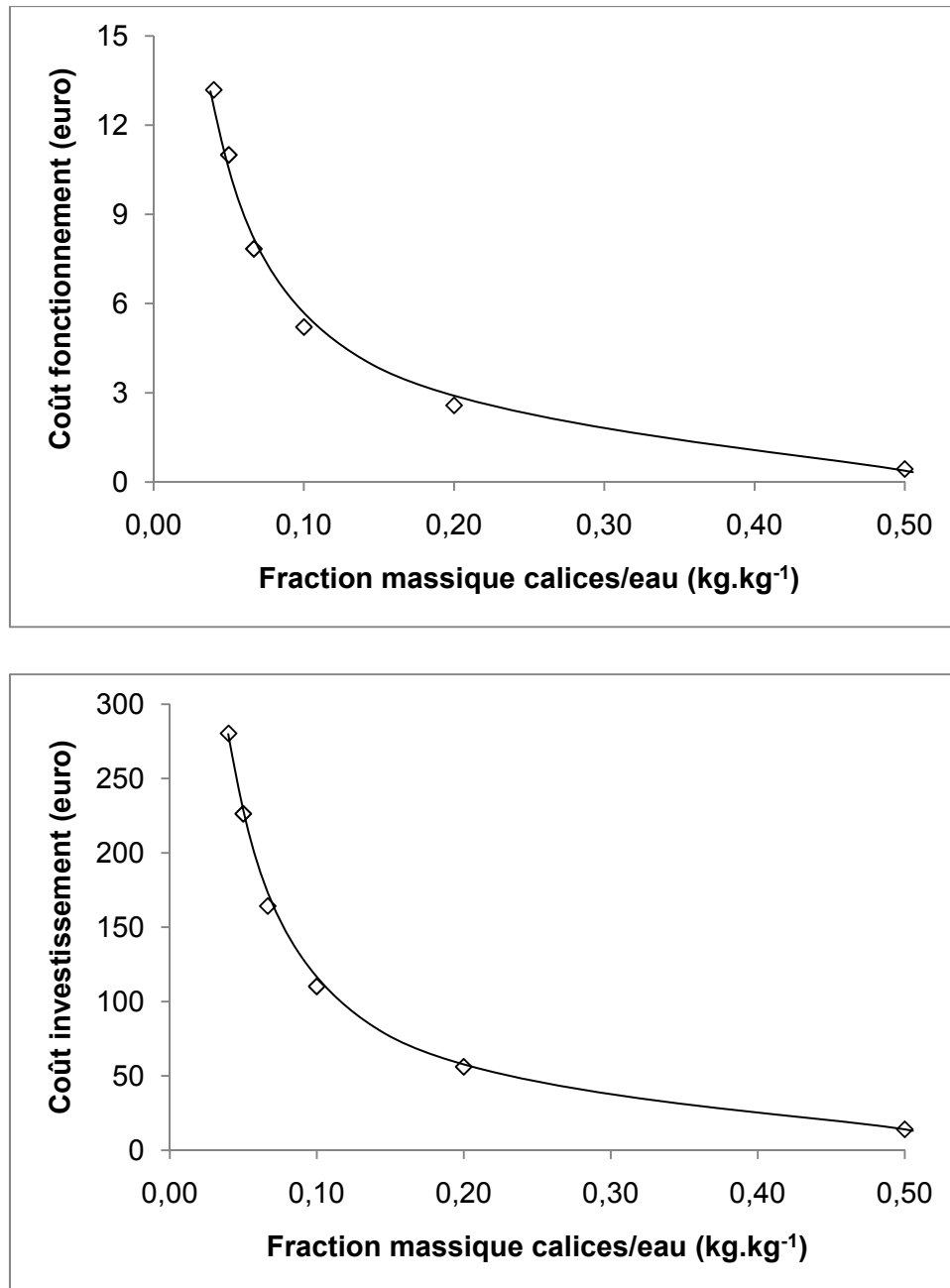


Figure 6. Influence de la fraction massique calices/eau utilisé en extraction sur les coûts de fonctionnement et d'investissement pour le couplage de procédés CP_{ENO}.

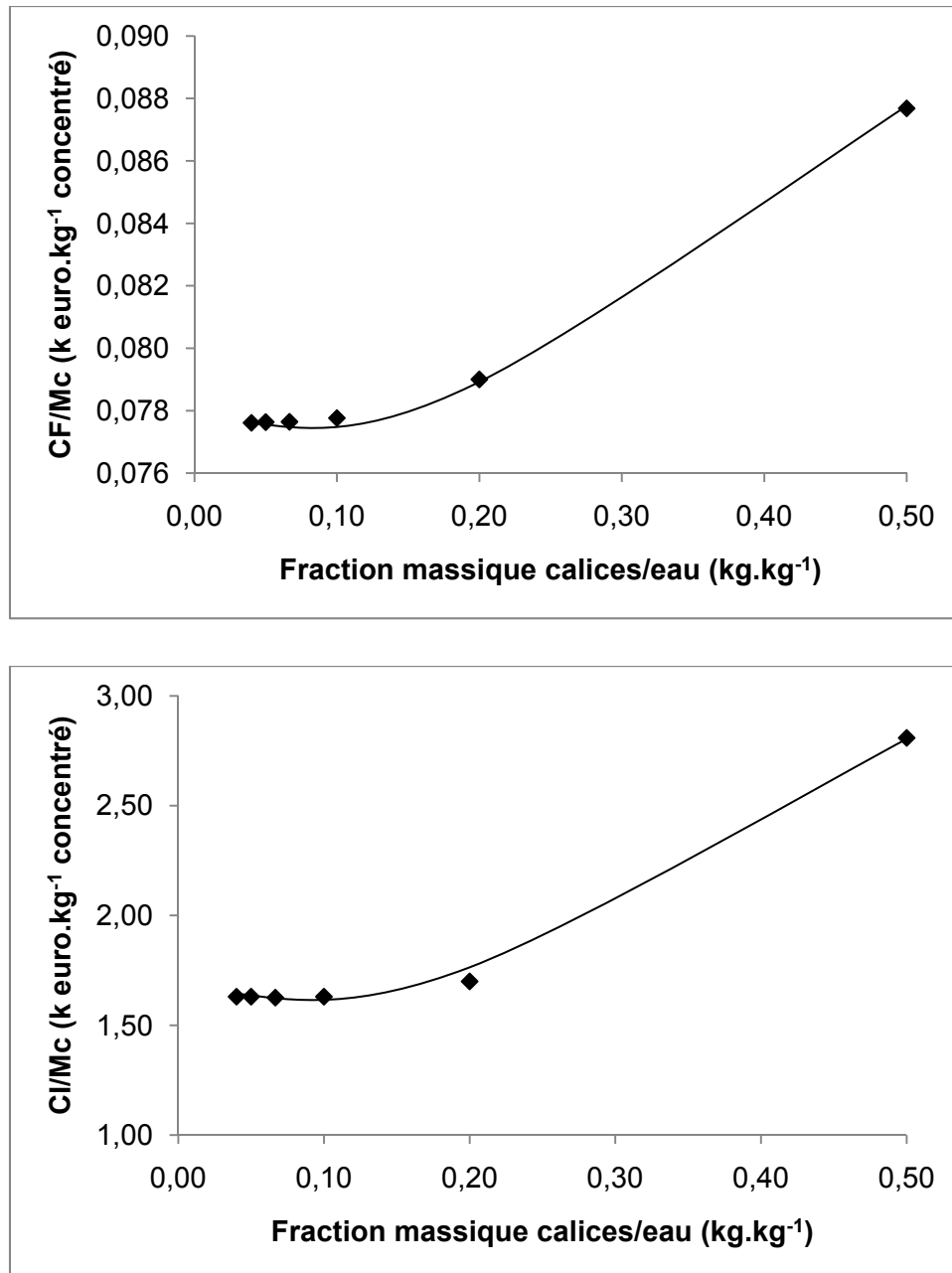


Figure 7. Coût de fonction ou d'investissement pour produire 1 kg de concentré à 600 g d'ESS.kg⁻¹ en fonction de la fraction massique calices/eau utilisée en extraction pour le couplage de procédés CP_{ENO}.

6-3-3- Influence de la teneur en extrait sec soluble finale au cours de la nanofiltration

Les coûts d'investissement et de fonctionnement et la qualité du produit sont fonction du ratio calices/eau et de la quantité d'eau à éliminer. Cette dernière est à l'origine de l'augmentation des coûts de fonctionnement dans les couplages mettant en jeu l'évaporation osmotique. L'influence de la teneur en extrait sec soluble de transition pour passer de la nanofiltration à l'évaporation osmotique doit donc être considérée.

La **figure 8** montre une diminution significative des coûts de fonctionnement et d'investissement lorsque la teneur en extrait sec soluble de transition augmente de 90 à 160 g.kg⁻¹ et ce, pour tous les ratios. L'impact de l'extrait sec de transition sur les coûts y est d'autant plus marqué que le ratio calices/eau utilisé pour l'extraction est faible. A partir d'un extrait sec soluble de 130 g.kg⁻¹, les coûts tendent par contre à devenir constants surtout pour les ratios élevés (1/2, 1/5) et intermédiaires (1/15). Cette diminution des coûts est liée essentiellement à celle des surfaces membranaires à installer comme le montre le **tableau 5**.

Conclusion

Le procédé qui associe une extraction à froid à 25 °C, une pré-concentration par nanofiltration à un extrait sec élevé et une concentration par évaporation osmotique (CP_{ENO}) est la meilleure voie pour produire un extrait anthocyannique concentré tant en terme de coût d'investissement et de fonctionnement que de qualité du concentré. L'évaporation osmotique simple ou bi-étagée permet également la production de concentré de qualité équivalente à celle du couplage extraction, nanofiltration et évaporation osmotique mais avec des coûts de fonctionnement beaucoup plus élevés. La régénération du chlorure de calcium est le principal facteur alourdissant le coût de fonctionnement. Les faibles densités de flux évaporatoire obtenus et la gestion des solutions extractantes sont les deux principaux freins au développement industriel du procédé d'évaporation osmotique.

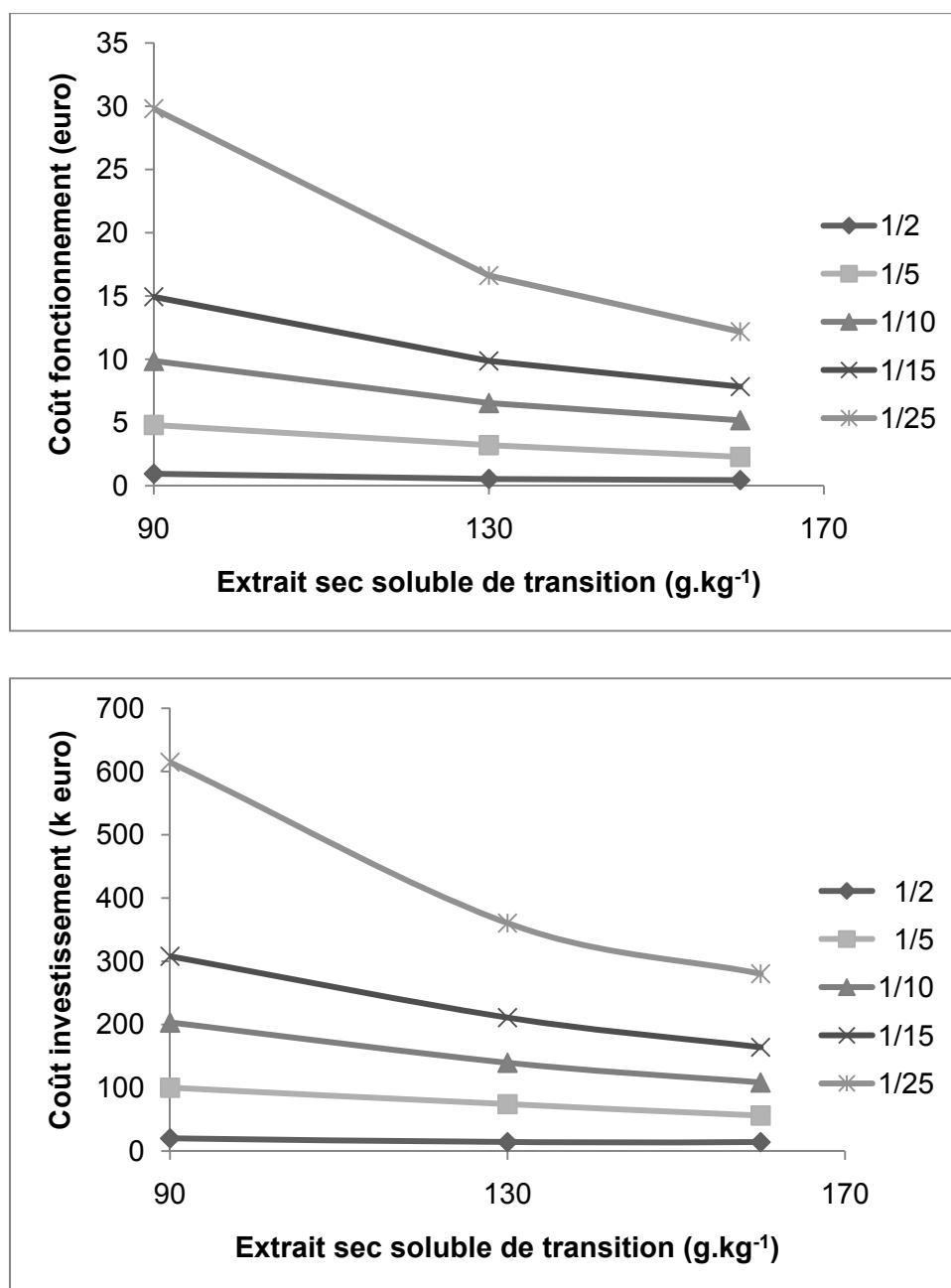


Figure 8. Evolution des coûts de fonctionnement et d'investissement en fonction de la teneur en extrait sec soluble de transition entre la nanofiltration à l'évaporation osmotique pour différents ratio d'extraction calices/eau (couplage CP_{ENO}).

Tableau 5 Répartition des surfaces membranaires dans le cas du couplage CP_{ENO} en fonction du ratio masse calices/eau et de la teneur en extrait sec soluble de transition (ESS_t) nanofiltration à évaporation osmotique.

FRV (ESS _t)		1/2	1/5	1/10	1/15	1/25
2 (90)	Nanofiltration	1	2	3	5	8
	Evaporation osmotique	3	16	33	50	100
	Surface totale installée (m ²)	4	18	36	55	108
3 (130)	Nanofiltration	1	4	7	11	18
	Evaporation osmotique	2	11	21	32	54
	Surface totale installée (m ²)	3	15	28	43	62
4 (160)	Nanofiltration	1	4	7	10	17
	Evaporation osmotique	2	11	16	24	41
	Surface totale installée (m ²)	3	15	23	34	58

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail de recherche mené entre deux pays, la France et le Sénégal, avait pour objectif l'intégration de plusieurs opérations unitaires pour la production d'extraits anthocyaniques à partir des calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Pour atteindre cet objectif, il a fallu d'abord optimiser au mieux les moyens disponibles au niveau de chaque pays en les intégrant dans une même chaîne malgré les barrières liées au temps et à l'espace.

A l'issue de trois années de recherche, nous avons abordé l'étude de 5 opérations unitaires : l'extraction solide-liquide à partir des calices secs d'*Hibiscus sabdariffa*, la stabilisation par microfiltration tangentielle de l'extrait, sa pré-concentration par ultrafiltration ou nanofiltration et enfin, sa concentration par évaporation osmotique. Pour les opérations de microfiltration, de nanofiltration et d'évaporation osmotique, des essais sur pilotes semi-industriels ont été réalisés. Au cours de l'étude de chaque procédé, nous avons recherché un mode de conduite qui permet leur association pour former une ligne de production d'extraits anthocyaniques.

La caractérisation physico-chimique et biochimique des calices d'*Hibiscus sabdariffa* a montré qu'ils contiennent entre 767 et 1480 mg.100g⁻¹ d'anthocyanes et entre 1347 et 3736 mg.100g⁻¹ de polyphénols totaux. Ils présentent un pouvoir antioxydant voisin de 260 μmolTrolox.g⁻¹. L'acide malique y est l'acide organique majoritaire avec une teneur pouvant atteindre 2,3 g.100g⁻¹. De part ces caractéristiques, l'extrait aqueux de calices d'*H. sabdariffa* constitue donc une excellente source d'anthocyanes.

L'étude sur la dégradation thermique et la stabilité des anthocyanes a mis en évidence la sensibilité de ces derniers à des températures élevées supérieures à 60 °C. Les cinétiques de dégradation thermique mesurées entre 60 et 90 °C sur différents extraits d'*H. sabdariffa* ont montré que la dégradation des anthocyanes suit une réaction d'ordre 1 avec des constantes de vitesse comprises entre 100 et 600.10⁻⁷ s⁻¹. Un comportement cinétique d'ordre 1 gouverne également l'évolution de la concentration en anthocyanes durant le stockage des extraits de 4 à 45 °C. La température est le principal facteur de dégradation et de perte de stabilité des anthocyanes. L'effet de l'oxygène reste limité. Trois modèles cinétiques, Arrhenius, Ball et Eyring ont pu être utilisés pour déterminer les paramètres cinétiques tels que l'énergie d'activation, l'enthalpie d'activation et le facteur z. Ces modèles peuvent valablement être mobilisés pour prédire les pertes en anthocyanes et les variations des paramètres colorimétriques des extraits (force colorante, indice brun, densité de couleur) lors d'un traitement thermique ou pendant la conservation du produit.

L'optimisation de l'extraction aqueuse montre que la taille des particules et le ratio massique calices/eau sont les deux facteurs clés influençant le rendement d'extraction et la teneur en anthocyanes de l'extrait. Le rendement est d'autant plus important (88 %) que le ratio est faible (1/25). De même une réduction de la taille des calices de 2 cm à 150 μm engendre une diminution considérable du temps d'extraction qui passe de plusieurs heures à moins de 10 min avec une augmentation des rendements de 65 à 125 %. L'augmentation de la température de 25 à 90 °C se traduit également par une réduction du temps d'extraction consécutive à une augmentation du coefficient de diffusion efficace qui passe de 3,96.10⁻¹¹ à 1,02.10⁻¹¹ m².s⁻¹.

Aucun impact sur le rendement ou la concentration en anthocyanes n'est par contre observé. Un modèle incluant la taille des calices, la température d'extraction, le ratio calices/eau et la dégradation thermique des anthocyanes permet de prédire les rendements et les concentrations en anthocyanes. Ce modèle peut valablement être exploité dans le cas d'une production industrielle. Un compromis doit nécessairement être trouvé entre le rendement et la concentration en anthocyanes.

La microfiltration tangentielle appliquée sur un extrait d'*Hibiscus sabdariffa* permet de produire un extrait stérilisé à froid, stable pendant 90 j à des températures de 4 et 20 °C. L'optimisation de la pression transmembranaire appliquée lors de la microfiltration a été effectuée à facteur de réduction volumique (FRV) constant égal à 1 et à FRV croissant jusqu'à 20. Les résultats montrent que les pressions optimales dans chaque cas sont significativement différentes. La démarche classique consistant à optimiser les paramètres lors des essais à FRV constant et à les considérer comme optimum lors des essais à FRV croissant est donc remise en cause dans notre cas.

L'ultrafiltration et la nanofiltration sont des alternatives intéressantes pour pré-concentrer les anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* tout en conservant les qualités initiales de l'extrait brut. Des densités de flux de perméat compatibles avec une utilisation industrielle ($40 \text{ kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) et des taux de rétention en anthocyanes de 100 % sont obtenus avec plusieurs membranes provenant de divers fournisseurs.

La concentration finale de l'extrait par une technique qui permette de conserver tout le potentiel du produit est nécessaire pour élaborer un extrait anthocyanique de qualité. Le pilote d'évaporation osmotique semi-industriel utilisé au cours de ces travaux a permis d'atteindre des teneurs en extrait sec soluble supérieures à 600 g.kg^{-1} à 45 °C. Malgré, les faibles flux évaporatoires, avoisinant $1,4 \text{ kg.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, la qualité organoleptique et nutritionnelle des produits a été conservée.

L'intégration dans une chaîne continue de ces cinq opérations a montré que plusieurs configurations sont possibles pour produire un extrait anthocyanique de qualité avec une teneur en extrait sec soluble de 600 g.kg^{-1} . Le couplage incluant l'extraction à froid, une étape de pré-concentration par nanofiltration à 35 °C et une concentration finale par évaporation osmotique à 45 °C est la voie la plus économique tant en termes de coût d'investissement que de fonctionnement. Une meilleure gestion de la saumure permettrait au couplage mettant en jeu l'évaporation osmotique d'être plus compétitive.

A ce point de nos investigations, plusieurs perspectives de recherches ont été identifiées. Au niveau de la stabilité des anthocyanes, l'analyse et l'identification des produits de dégradation permettrait de mieux comprendre les mécanismes réactionnels mis en jeu. Une étude plus approfondie sur l'optimisation des paramètres opératoires en microfiltration tangentielle à FRV constant et croissant devra être menée sur plusieurs produits réels et/ou solutions modèles. En ultrafiltration et nanofiltration des expériences complémentaires devront être mis en place pour comprendre les mécanismes de rétention des différents composés. Il serait

également pertinent de compléter ce travail en appliquant ces procédés à d'autres extraits végétaux afin de mieux évaluer leurs potentialités pour purifier et/ou concentrer des composés phénoliques. En évaporation osmotique, un travail spécifique portant sur le recyclage de la saumure en utilisant des techniques efficaces en énergie paraît nécessaire avant toute étape d'industrialisation. Parallèlement le développement de membranes capables de traiter aussi bien des jus pulpeux et clarifiés doit être envisagé. Enfin, l'étude de la stabilité du concentré obtenu est indispensable.

Néanmoins, il est d'ores et déjà possible de mettre à profit les résultats obtenus au cours de ce travail pour produire une boisson d'*Hibiscus sabdariffa* stérilisée à froid et un extrait pré-concentré de très bonne qualité conservant toutes les caractéristiques du produit initial.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES

1. Sarni-Manchando, P.; Cheynier, V., *Les polyphénols en agroalimentaire*. Tec. et doc. ed.; Lavoisier: Paris, **2006**.
2. Downham, A.; Collins, P., Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology* **2000**, 35, (1), 5-22.
3. Ben Amar, N.; Saidani, H.; Palmeri, J.; Deratani, A., Effect of temperature on the rejection of neutral and charged solutes by Desal 5 DK nanofiltration membrane. *Desalination* **2009**, 246, (1-3), 294-303.
4. Cuartas-Urbe, B.; Vincent-Vela, M. C.; Álvarez-Blanco, S.; Alcaina-Miranda, M. I.; Soriano-Costa, E., Nanofiltration of sweet whey and prediction of lactose retention as a function of permeate flux using the Kedem-Spiegler and Donnan Steric Partitioning models. *Separation and Purification Technology* **2007**, 56, (1), 38-46.
5. Voutsas, E. C.; Andreou, C. I.; Theodorou, D. G.; Tassios, D. P., Prediction of infinite dilution volatilities of aroma compounds in water. *Journal of Food Science* **2001**, 66, No. 3, 447-452.
6. Cisse, M.; Vaillant, F.; Perez, A.; Dornier, M.; Reynes, M., The quality of orange juice processed by coupling crossflow microfiltration and osmotic evaporation. *International Journal of Food Science and Technology* **2005**, 40, (1), 105-116.
7. Vaillant, F.; Cisse, M.; Chaverri, M.; Perez, A.; Dornier, M.; Viquez, F.; Dhuique-Mayer, C., Clarification and concentration of melon juice using membrane processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2005**, 6, (2), 213-220.
8. Bimbenet, J. J.; Duquenoy, A.; Trystram, G., *Génie des procédés alimentaires - Des bases aux applications*. 2ème ed.; Dunod: Paris, **2008**; p 554.
9. Blumberg, S.; Frank, O.; Hofmann, T., Quantitative Studies on the Influence of the Bean Roasting Parameters and Hot Water Percolation on the Concentrations of Bitter Compounds in Coffee Brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008** 58, (6), 3720-3728.
10. Gouw-Soares, S.; Stabholz, A.; Lage-Marques, J. L.; Zezell, D. M.; Groth, E. B.; Eduard, C. P., Comparative study of dentine permeability after apicectomy and surface treatment with 9.6 μm TEA CO₂ and Er : YAG laser irradiation. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* **2004**, 22, (2), 129-139.
11. Li, Y.; Wang, M. Y.; Fan, X. S.; Qi, X.; Chen, Y.; Zhang, H. A.; Zhao, Q. C., Effect of San-ao Decoction, a traditional Chinese prescription, on IL-4 treated normal human bronchial epithelium. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, 131, (1), 104-109.
12. Wang, A. X.; Ge, G. B.; Qi, X. Y.; Hu, Y.; Liang, S. C.; Yang, L.; Tu, C. X., Rapid profiling and target analysis of principal components in Fuling Decoctions by UFLC-DAD-ESI-MS. *Fitoterapia* **2000**, 81, (6), 662-667.
13. Bancirova, M., Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International* **2009**, 43, (5), 1379-1382.
14. Ni, W. W.; Suriah, A. R., Effect of Infusion on Fluoride Concentration in Various Chinese Tea. *Sains Malaysiana* **2010**, 39, (4), 581-586.
15. Czyzowska, A.; Pogorzelski, E., Changes to polyphenols in the process of production of must and wines from blackcurrants and cherries. Part II. Anthocyanins and flavanols. *European Food Research and Technology* **2004**, 218, (4), 355-359.
16. Fuleki, T.; Ricardo-Da-Silva, J. M., Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, (3), 640-646.
17. Albernaz, L. C.; de Paula, J. E.; Romero, G. A. S.; Silva, M. D. R.; Grellier, P.; Mambu, L.; Espindola, L. S., Investigation of plant extracts in traditional medicine of

- the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *Journal of Ethnopharmacology* **131**, (1), 116-121.
18. Budak, H. N.; Guzel-Seydim, Z. B., Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1990**, (12), 2021-2026.
19. Sun, Y. S.; Wang, J. H.; Gu, S. B.; Liu, Z. B.; Zhang, Y. J.; Zhang, X. X., Simultaneous Determination of Flavonoids in Different Parts of Citrus reticulata 'Chachi' Fruit by High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection. *Molecules* **2010**, *15*, (8), 5378-5388.
20. Guerrero, M. S.; Torres, J. S.; Nunez, M. J., Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, (5), 1311-1318.
21. Gao, L.; Mazza, G., Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls. *Journal of Food Science* **1996**, *61*, (3), 600-603.
22. Leybros, J.; Frémeaux, P., Extraction solide-liquide- Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieurs, traité Génie des procédés* **2009**, J 2780-1 -J 2780-21.
23. Turker, N.; Erdogan, F., Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *Journal of Food Engineering* **2006**, *76*, (4), 579-583.
24. Nyam, K. L.; Tan, C. P.; Lai, O. M.; Long, K.; Che Man, Y. B., Optimization of supercritical fluid extraction of phytosterol from roselle seeds with a central composite design model. *Food and Bioproducts Processing* **1988**, (2-3), 239-246.
25. Prenesti, E.; Berto, S.; Daniele, P. G.; Toso, S., Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry* **2007**, *100*, (2), 433-438.
26. Wong, P. K.; Yusof, S.; Ghazali, H. M.; Che Man, Y. b., Optimization of hot water extraction of roselle juice using response surface methodology: a comparative study with other extraction methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, *83*, (12), 1273-1278.
27. Cacace, J. E.; Mazza, G., Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, (21), 5939-5946.
28. Cacace, J. E.; Mazza, G., Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* **2003**, *59*, (4), 379-389.
29. Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J.; Nunez, M. J., Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, (6), 2111-2117.
30. Wiesenborn, D. P.; Wang, J.; Chang, K. C.; Schwarz, J. G., Comparison of continuous and batch processes for pectin extraction from sunflower heads. *Industrial Crops and Products* **1999**, *9*, (3), 171-181.
31. Humphrey, J. L.; Keller II, G. E., *Procédés de séparation : techniques, sélection, dimensionnement*. Dunod: Paris, 2001; p 356.
32. Guillon, M., Membranes de filtration : plus de résistance, moins de colmatage. *Process Alimentaire* **2009**, 155.
33. Brun, J. P., *Procédés de séparation par membranes- Transport Techniques membranaires Applications*. Masson: Paris, 1989; p 270.
34. Maurel, A., Techniques séparatives à membranes : considérations théoriques. *Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés* **2009**, J 2790-1 - J 2790-23.

35. Schmitz, P.; Wandelt, B.; Houi, D.; Hildenbrand, M., Particle aggregation at the membrane surface in crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science* **1993**, 84, (1-2), 171-183.
36. Hajipour, M.; Soltanieh, M.; Yazdanshenas, M., Investigation of membrane fouling in cross flow microfiltration of non-alcoholic beer and modeling of tubular membrane flow. *Desalination* **2010**, 251, (1-3), 20-28.
37. Bowen, W. R.; Jenner, F., Theoretical descriptions of membrane filtration of colloids and fine particles: An assessment and review. *Advances in Colloid and Interface Science* **1995**, 56, 141-200.
38. Li, M.; Zhao, Y.; Zhou, S.; Xing, W., Clarification of raw rice wine by ceramic microfiltration membranes and membrane fouling analysis. *Desalination* **2010**, 256, (1-3), 166-173.
39. Ulbricht, M.; Ansorge, W.; Danielzik, I.; König, M.; Schuster, O., Fouling in microfiltration of wine: The influence of the membrane polymer on adsorption of polyphenols and polysaccharides. *Separation and Purification Technology* **2009**, 68, (3), 335-342.
40. Riedl, K.; Girard, B.; Lencki, R. W., Influence of membrane structure on fouling layer morphology during apple juice clarification. *Journal of Membrane Science* **1998**, 139, (2), 155-166.
41. Jimenez-Lopez, A. J. E.; Leconte, N.; Dehainault, O.; Geneste, C.; Fromont, L.; Gesan-Guizieu, G., Role of milk constituents on critical conditions and deposit structure in skimmilk microfiltration (0.1 μ m). *Separation and Purification Technology* **2008**, 61, (1), 33-43.
42. Yu, J.; Lencki, R. W., Effect of enzyme treatments on the fouling behavior of apple juice during microfiltration. *Journal of Food Engineering* **2004**, 63, (4), 413-423.
43. Vaillant, F.; Millan, P.; O'Brien, G.; Dornier, M.; Decloux, M.; Reynes, M., Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering* **1999**, 42, (4), 215-224.
44. Almandoz, C.; Pagliero, C.; Ochoa, A.; Marchese, J., Corn syrup clarification by microfiltration with ceramic membranes. *Journal of Membrane Science* **2010**, 363, (1-2), 87-95.
45. Xiao, K.; Wang, X. M.; Huang, X.; Waite, T. D.; Wen, X. H., Analysis of polysaccharide, protein and humic acid retention by microfiltration membranes using Thomas' dynamic adsorption model. *Journal of Membrane Science* **2009**, 342, (1-2), 22-34.
46. Vernhet, A.; BellonFontaine, M. N.; Brillouet, J. M.; Roesink, E.; Moutounet, M., Wetting properties of microfiltration membrane: Determination by means of the capillary rise technique and incidence on the adsorption of wine polysaccharide and tannins. *Journal of Membrane Science* **1997**, 128, (2), 163-174.
47. Belleville, M. P.; Brillouet, J. M.; De La Fuente, B. T.; Moutounet, M., Fouling Colloids During Microporous Alumina Membrane Filtration of Wine. *Journal of Food Science* **1992**, 57, (2), 396-400.
48. Gan, Q.; Field, R. W.; Bird, M. R.; England, R.; Howell, J. A.; McKechnie, M. T.; Oshaughnessy, C. L., Beer clarification by cross-flow microfiltration: Fouling mechanisms and flux enhancement. *Chemical Engineering Research & Design* **1997**, 75, (A1), 3-8.
49. Alvarez, V.; Andres, L. J.; Riera, F. A.; Alvarez, R., Microfiltration of apple juice using inorganic membranes: Process optimization and juice stability. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **1996**, 74, (1), 156-162.

50. Rektor, A.; Vatai, G., Application of membrane filtration methods for must processing and preservation. *Desalination* **2004**, 162, 271-277.
51. Vaillant, F.; Millan, A.; Dornier, M.; Decloux, M.; Reynes, M., Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering* **2001**, 48, (1), 83-90.
52. Girard, B.; Fukumoto, L. R., Membrane processing of fruit juices and beverages: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* **2000**, 20, (2), 109-175.
53. Watanabe, A. P.; Ushikubo, F. Y.; Viotto, L. A., Evaluation of permeate flux in microfiltration of Tamarind (*Tamarindus indica* L.) juice using polypropylene membrane. *Desalination* **2006**, 200, (1-3), 337-338.
54. Cisse, M.; Sakho, M.; Dornier, M.; Diop, C. M.; Reynes, M.; Sock, O., Characterization of the baobab tree fruit and study of its processing into nectar. *Fruits* **2009**, 64, (1), 19-34.
55. Rektor, A.; Vatai, G.; Bekassy-Molnar, E., Multi-step membrane processes for the concentration of grape juice. *Desalination* **2006**, 191, (1-3), 446-453.
56. Laorko, A.; Li, Z. Y.; Tongchitpakdee, S.; Chantachum, S.; Youravong, W., Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and permeate flux during clarification of pineapple juice. *Journal of Food Engineering* **2010**, 100, (3), 514-521.
57. Carneiro, L.; dos Santos Sa, I.; dos Santos Gomes, F.; Matta, V. M.; Cabral, L. M. C., Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. *Desalination* **2002**, 148, (1-3), 93-98.
58. Matta, V. M.; Moretti, R. H.; Cabral, L. M. C., Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. *Journal of Food Engineering* **2004**, 61, (3), 477-482.
59. Abreu, F.; Perez A.M.; M., D.; Reynes, M., Potentialités de la microfiltration tangentielle sur membranes minérales pour la clarification du jus de pomme de cajou. *Fruits* **2005**, 60, 33-40.
60. Cheryan, M. A., J. R. , *Food and beverage industry application. dans Membrane separation technology, principles and applications*. R.D. NOBLE et S.A. STERN , Elsevier Science B.V: USA, 1995.
61. Vaillant, F.; Perez, A. M.; Acosta, O.; Dornier, M., Turbidity of pulpy fruit juice: A key factor for predicting cross-flow microfiltration performance. *Journal of Membrane Science* **2008**, 325, (1), 404-412.
62. Ushikubo, F. Y.; Watanabe, A. P.; Viotto, L. A., Microfiltration of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) juice. *Journal of Membrane Science* **2007**, 288, (1-2), 61-66.
63. Capannelli, G.; Bottino, A.; Munari, S.; Lister, D. G.; Maschio, G.; Becchi, I., The use of membrane processes in the clarification of orange and lemon juices. *Journal of Food Engineering* **1994**, 21, (4), 473-483.
64. Nandi, B. K.; Das, B.; Uppaluri, R.; Purkait, M. K., Microfiltration of mosambi juice using low cost ceramic membrane. *Journal of Food Engineering* **2009**, 95, (4), 597-605.
65. Nandi, B. K.; Uppaluri, R.; Purkait, M. K., Identification of optimal membrane morphological parameters during microfiltration of mosambi juice using low cost ceramic membranes. *LWT - Food Science and Technology* **2010**, 44, (1), 214-223.
66. Fukumoto, L. R.; Delaquis, P.; Girard, B., Microfiltration and ultrafiltration ceramic membranes for apple juice clarification. *Journal of Food Science* **1998**, 63, (5), 845-850.

67. Moulai-Mostefa, N.; Frappart, M.; Akoum, O.; Ding, L.; Jaffrin, M. Y., Separation of water from metal working emulsions by ultrafiltration using vibratory membranes. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, 177, (1-3), 978-982.
68. Cassini, A. S.; Tessaro, I. C.; Marczak, L. D. F.; Pertile, C., Ultrafiltration of wastewater from isolated soy protein production: A comparison of three UF membranes. *Journal of Cleaner Production* **2010**, 18, (3), 260-265.
69. Sen, D.; Roy, W.; Das, L.; Sadhu, S.; Bhattacharjee, C., Ultrafiltration of macromolecules using rotating disc membrane module (RDMM) equipped with vanes: Effects of turbulence promoter. *Journal of Membrane Science* **2010**, 360, (1-2), 40-47.
70. Rai, P.; Rai, C.; Majumdar, G. C.; DasGupta, S.; De, S., Resistance in series model for ultrafiltration of mosambi (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice in a stirred continuous mode. *Journal of Membrane Science* **2006**, 283, (1-2), 116-122.
71. Todisco, S.; Tallarico, P.; Gupta, B. B., Mass transfer and polyphenols retention in the clarification of black tea with ceramic membranes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2002**, 3, (3), 255-262.
72. Audinos, R., Membranes semi-perméables-Membranes de nanofiltration. In *Techniques de l'ingénieur, traité Constantes physico-chimiques*, Paris, 2008; pp K 363-1 - k 363-9.
73. Guizard, C., *Guide de la nanofiltration*. CFM: France, **2000**; p 64.
74. Vladana, M.; Martinea, M. P.; Jean-François, F., Application de la nanofiltration : Approche intégrale. *Récents Progrès en Génie des Procédés* **2005**, 92, 7 p.
75. Warczok, J.; Ferrando, M.; López, F.; Güell, C., Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. *Journal of Food Engineering* **2004**, 63, (1), 63-70.
76. Nilsson, M.; Trägårdh, G.; Östergren, K., The influence of pH, salt and temperature on nanofiltration performance. *Journal of Membrane Science* **2008**, 312, (1-2), 97-106.
77. He, Y.; Ji, Z.; Li, S., Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment. *Separation and Purification Technology* **2007**, 57, (2), 366-373.
78. Yazdanshenas, M.; Tabatabaee-Nezhad, S. A. R.; Soltanieh, M.; Roostaazad, R.; Khoshfetrat, A. B., Contribution of fouling and gel polarization during ultrafiltration of raw apple juice at industrial scale. *Desalination* **2010**, 258, (1-3), 194-200.
79. Cassano, A.; Tasselli, F.; Conidi, C.; Drioli, E., Ultrafiltration of Clementine mandarin juice by hollow fibre membranes. *Desalination* **2009**, 241, (1-3), 302-308.
80. Galaverna, G.; Di Silvestro, G.; Cassano, A.; Sforza, S.; Dossena, A.; Drioli, E.; Marchelli, R., A new integrated membrane process for the production of concentrated blood orange juice: Effect on bioactive compounds and antioxidant activity. *Food Chemistry* **2008**, 106, (3), 1021-1030.
81. Cassano, A.; Marchio, M.; Drioli, E., Clarification of blood orange juice by ultrafiltration: analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. *Desalination* **2007**, 212, (1-3), 15-27.
82. Tasselli, F.; Cassano, A.; Drioli, E., Ultrafiltration of kiwifruit juice using modified poly(ether ether ketone) hollow fibre membranes. *Separation and Purification Technology* **2007**, 57, (1), 94-102.
83. de Barros, S. T. D.; Andrade, C. M. G.; Mendes, E. S.; Peres, L., Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* **2003**, 215, (1-2), 213-224.
84. Laorko, A.; Li, Z.; Tongchitpakdee, S.; Chantachum, S.; Youravong, W., Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and

- permeate flux during clarification of pineapple juice. *Journal of Food Engineering* **2010**, 100, (3), 514-521.
85. Cassano, A.; Conidi, C.; Drioli, E., Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. *Desalination* **2010**, 250, (3), 1101-1104.
86. Hadj L. R. Elaboration et étude des propriétés de transfert de membranes de nanofiltration et d'osmose inverse réalisées à partir des couches de polyélectrolytes Université Montpellier 2, France, 2003.
87. Plakas, K. V.; Karabelas, A. J.; Wintgens, T.; Melin, T., A study of selected herbicides retention by nanofiltration membranes--The role of organic fouling. *Journal of Membrane Science* **2006**, 284, (1-2), 291-300.
88. Mänttari, M.; Nyström, M., Critical flux in NF of high molar mass polysaccharides and effluents from the paper industry. *Journal of Membrane Science* **2000**, 170, (2), 257-273.
89. Mänttari, M.; Viitikko, K.; Nyström, M., Nanofiltration of biologically treated effluents from the pulp and paper industry. *Journal of Membrane Science* **2006**, 272, (1-2), 152-160.
90. Yoon, Y.; Lueptow, R. M., Removal of organic contaminants by RO and NF membranes. *Journal of Membrane Science* **2005**, 261, (1-2), 76-86.
91. Yoon, Y.; Westerhoff, P.; Snyder, S. A.; Wert, E. C., Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. *Journal of Membrane Science* **2006**, 270, (1-2), 88-100.
92. Noronha, M.; Britz, T.; Mavrov, V.; Janke, H. D.; Chmiel, H., Treatment of spent process water from a fruit juice company for purposes of reuse: hybrid process concept and on-site test operation of a pilot plant. *Desalination* **2002**, 143, (2), 183-196.
93. Blocher, C.; Britz, T.; Janke, H. D.; Chmiel, H., *Biological treatment of wastewater from fruit juice production using a membrane bioreactor: parameters limiting membrane performance*. **2003**; p 253-259.
94. Blocher, C.; Noronha, M.; Funfrocken, L.; Dorda, J.; Mavrov, V.; Janke, H. D.; Chmiel, H., Recycling of spent process water in the food industry by an integrated process of biological treatment and membrane separation. *Desalination* **2002**, 144, (1-3), 143-150.
95. Arros-Alileche, S.; Merin, U.; Daufin, G.; Gésan-Guizieu, G., The membrane role in an anaerobic membrane bioreactor for purification of dairy wastewaters: A numerical simulation. *Bioresource Technology* **2008**, 99, (17), 8237-8244.
96. Nanda, D.; Tung, K.-L.; Li, Y.-L.; Lin, N.-J.; Chuang, C.-J., Effect of pH on membrane morphology, fouling potential, and filtration performance of nanofiltration membrane for water softening. *Journal of Membrane Science* **2010**, 349, (1-2), 411-420.
97. Bodzek, M.; Dudziak, M.; Luks-Betlej, K., Application of membrane techniques to water purification. Removal of phthalates. *Desalination* **2004**, 162, 121-128.
98. Bouchoux, A.; Roux-de Balman, H.; Lutin, F., Investigation of nanofiltration as a purification step for lactic acid production processes based on conventional and bipolar electrodialysis operations. *Separation and Purification Technology* **2006**, 52, (2), 266-273.
99. Minhalma, M.; Magueijo, V.; Queiroz, D. P.; de Pinho, M. N., Optimization of "Serpa" cheese whey nanofiltration for effluent minimization and by-products recovery. *Journal of Environmental Management* **2007**, 82, (2), 200-206.
100. Rektor, A.; Vatai, G., Membrane filtration of Mozzarella whey. *Desalination* **2004**, 162, 279-286.

101. Sjöman, E.; Mänttari, M.; Nyström, M.; Koivikko, H.; Heikkilä, H., Separation of xylose from glucose by nanofiltration from concentrated monosaccharide solutions. *Journal of Membrane Science* **2007**, 292, (1-2), 106-115.
102. Zhao, Y.; Yuan, Q., A comparison of nanofiltration with aqueous and organic solvents. *Journal of Membrane Science* **2006**, 279, (1-2), 453-458.
103. Vincze, I.; Bányai-Stefanovits, É.; Vatai, G., Concentration of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice with membrane separation. *Separation and Purification Technology* **2007**, 57, (3), 455-460.
104. Ferrarini, R.; Versari, A.; Galassi, S., A preliminary comparison between nanofiltration and reverse osmosis membranes for grape juice treatment. *Journal of Food Engineering* **2001**, 50, (2), 113-116.
105. Gilewicz-Lukasik, B.; Koter, S.; Kurzawa, J., Concentration of anthocyanins by the membrane filtration. *Separation and Purification Technology* **2007**, 57, (3), 418-424.
106. Lefebvre, M. S. M. Osmotic concentration by membrane. WO 86/ 03135, 5 June 1986, 1986.
107. Johnson, R. A.; Valks, R. H.; Lefebvre, M. S., Osmotic Distillation - A low temperature concentration technique. *Australian Journal of Biotechnology* **1989**, 3, (3), 206-207 217.
108. Courel, M. Etude des transferts de matière en évaporation osmotique: application à la concentration de jus de fruit. Thèse Doctorat, Montpellier II, Montpellier, 1999.
109. Courel, M.; Rios, G. M.; Dornier, M.; REynes, M.; Deblay, P. In *La concentration de jus de fruits par évaporation osmotique*, Colloque CEE Université Industries "Les membranes et techniques séparatives", Toulouse, France, 13 juin 1996, 1996; Toulouse, France, 1996; pp C6-1-C6-7.
110. Deblay, P. In *Un nouveau procédé de concentration de solutions aqueuses : l'évaporation osmotique*, Interfiltra-Intermembrane 94, Paris (France), 15 Nov. 1994, 1994; Société Française de Filtration: Paris (France), 1994; pp 32-37.
111. Sheng, J.; Johnson, R. A.; Lefebvre, M. S. M., Mass and heat transfer mechanisms in the osmotic distillation process. *Desalination* **1991**, 80, 113-121.
112. Bandini, S.; Sarti, G. S. In *Vacuum membrane distillation as feasible alternative for VOC removal for water reuse*, Membrane Distillation, Osmotic Distillation and Membrane Contactors, Cetraro (CS), Italy, 2-4 juillet, 1998; IRMERC, C.-. Ed. Cetraro (CS), Italy, 1998; pp 54-57.
113. Courel, M.; Rios, G. M.; Dornier, M.; ReyneS, M. In *Influence of hydrodynamics on osmotic evaporation performance*, Membrane Distillation, Osmotic Distillation and Membrane Contactors, Cetraro (CS), Italy, 2-4 juillet, 1998; IRMERC, C.-. Ed. Cetraro (CS), Italy, 1998; pp 35-38.
114. Deblay, P., Un nouveau procédé de concentration de solutions aqueuses : l'évaporation osmotique. *BIOS* **1994**, (250), 56-57.
115. Hogan, P. A.; Canning, R. P.; Peterson, P. A.; Johnson, R. A.; Michaels, A. S., A new option: Osmotic distillation. *Chemical Engineering Progress* **1998**, 94 (7), 49-61.
116. Lawson, K. W.; Lloyd, D. R., Membrane distillation. *Journal of Membrane Science* **1997**, 124, (1), 1-25.
117. Lawson, K. W.; Hall, M. S.; Lloyd, D. R., Compaction of microporous membranes used in membrane distillation. I: Effect on gas permeability. *Journal of membrane science* **1995**, 101, (1-2), 99-108.
118. Mengual, J. I.; Pena, L., Membrane distillation. *Current Topics in Colloid & Interface Science* **1997**, 1, 17-29.
119. Smolders, K.; Franken, A. C. M., Terminology for membrane distillation. *Desalination* **1989**, 72, (3), 249-262.

120. Lawson, K. W.; Lloyd, D. R., Membrane distillation. *Journal of Membrane Science* **1997**, 124, 1-25.
121. Hogan, P. A.; Canning, R. P.; Peterson, P. A.; Johnson, R. A.; Michaels, A. S., A new option: Osmotic distillation. *Chemical Engineering Progress* **1998**, 94 (7), 49-61.
122. Couffin, N. Elimination de composés organohalogen volatils a l'état de traces dans l'eau par distillation membranaire sous vide. Thèse Doctorat, Toulouse, 2000.
123. Schofield, R. W. Membrane distillation. Doctor of Philosophy, University of New South Wales, 1989.
124. Ali, F. Etude des transferts de composés d'arôme au cours de la concentration par évaporation osmotique. ENSIA, France, 2004.
125. Schneider, K.; Hölz, W.; Wollbeck, R.; Ripperger, S., Membranes and modules for transmembrane distillation. *Journal of Membrane Science* **1988**, 39, 25-42.
126. Kimura, S.; Nakao, S. I.; ShimatanI, S. I., Transport phenomena in membrane distillation. *Journal of Membrane Science* **1987**, 33, 285-298.
127. Gostoli, C.; Sarti, G. C.; Matulli, S., low temperature distillation through hydrophobic membranes. *Sep. Sci. Technol* **1987**, 22, 855-872.
128. Kunz, W.; Benhabiles, A.; Ben-Aim, R., *Osmotic evaporation through macroporous hydrophobic membranes : a survey of current research and applications*. Journal of membrane science. 1996 vol. 121 (1) : pp. 25 - 36: 1996.
129. Lefebvre, M. S.; Johnson, R. A.; YIP, V. In *Theoretical and practical aspects of osmotic distillation*, In Proceeding of the 1987 International Congress on Membrane and Membrane Processes, Tokyo, 1987; Tokyo, 1987; pp 55-56.
130. Alves, V. D.; Coelho, I. M., Mass transfer in osmotic evaporation: effect of process parameters. *Journal of Membrane Science* **2002**, 208, (1-2), 171-179.
131. Hogan, P. A.; Canning, R. P.; Peterson, P. A.; Johnson, R. A.; Michaels, A. S., A new option: Osmotic distillation. *Chemical Engineering Progress* **1998**, 94, (7), 49-61.
132. Kunz, W.; Benhabiles, A.; Ben-Aïm, R., Osmotic evaporation through macroporous hydrophobic membranes: a survey of current research and applications. *Journal of Membrane Science* **1996**, 121, (1), 25-36.
133. Bailey, A. F. G.; Barbe, A. M.; Hogan, P. A.; Johnson, R. A.; Sheng, J., The effect of ultrafiltration on the subsequent concentration of grape juice by osmotic distillation. *Journal of Membrane Science* **2000**, 164, (1-2), 195-204.
134. Courel, M.; Tronel-Peyroz, E.; Rios, G. M.; Dornier, M.; Reynes, M., The problem of membrane characterization for the process of osmotic distillation. *Desalination* **2001**, 140, (1), 15-25.
135. Barbe, A. M.; Bartley, J. P.; Jacobs, A. L.; Johnson, R. A., Retention of volatile organic flavour/fragrance components in the concentration of liquid foods by osmotic distillation. *Journal of Membrane Science* **1998**, 145, (1), 67-75.
136. Gostoli, C., Thermal effects in osmotic distillation. *Journal of Membrane Science* **1999**, 163, (1), 75-91.
137. Rodrigues, R. B.; Menezes, H. C.; Cabral, L. M. C.; Dornier, M.; Rios, G. M.; Reynes, M., *Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu-camu juice (Myrciaria dubia)*. Journal of food engineering. 2004 vol. 63 (1) : pp. 97 - 102 [6 p.]: 2004.
138. Tomaszewska, M.; Gryta, M.; Morawski, A. W., Study on the concentration of acids by membrane distillation. *Journal of Membrane Science* **1995**, 102, 113-122.
139. Ortiz-Zárate, J. M.; García López, F.; Mengual, J. I., Non-isothermal water transport through membranes. *Journal of Membrane Science* **1991**, 56, (2), 181-194.
140. Mansouri, J.; Fane, A. G., Osmotic distillation of oily feeds. *Journal of membrane science* **1999**, 153, (1), 103-120.

141. Cisse, M.; Vaillant, F.; Perez, A.; Dornier, M.; Reynes, M., The quality of orange juice processed by coupling crossflow microfiltration and osmotic evaporation. **2005**.
142. Vaillant, F.; Jeanton, E.; Dornier, M.; O'Brien, G. M.; Reynes, M.; Decloux, M., Concentration of passion fruit juice on an industrial pilot scale using osmotic evaporation. *Journal of Food Engineering* **2001**, 47, (3), 195-202.
143. Cassano, A.; Drioli, E.; Galaverna, G.; Marchelli, R.; Di Silvestro, G.; Cagnasso, P., Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. *Journal of food engineering* **2003**, 57, (2), 153-163.
144. Cassano, A.; Jiao, B.; Drioli, E., Production of concentrated kiwifruit juice by integrated membrane process. *Food Research International* **2004**, 37, (2), 139-148.
145. Hongvaleerat, C.; Cabral, L. M. C.; Dornier, M.; Reynes, M.; Ningsanond, S., Concentration of pineapple juice by osmotic evaporation. *Journal of Food Engineering* **2008**, 88, (4), 548-552.
146. Valdes, H.; Romero, J.; Saavedra, A.; Plaza, A.; Bubnovich, V., Concentration of noni juice by means of osmotic distillation. *Journal of Membrane Science* **2009**, 330, (1-2), 205-213.
147. Celere, M.; Gostoli, C., Osmotic distillation with propylene glycol, glycerol and glycerol-salt mixtures. *Journal of Membrane Science* **2004**, 229, (1-2), 159-170.
148. Alves, V. D.; Coelho, I. M., Mass transfert in osmotic evaporation:effect of process parameters. *J.Memb.Sci* **2002**, 208, 171-179.
149. Sheng, J. In *Osmotic distillation technology and its applications*, Australian Chemical Engineering Conference, 1993; 1993; pp 429-432.
150. Vaillant, F.; Jeanton, E.; Dornier, M.; O'Brien, G. M.; Reynes, M.; Decloux, M., Concentration of passion fruit juice on an industrial pilot scale using osmotic evaporation. *Journale of Food Engineering* **2001**, 47, 195-202.
151. Lefebvre, M. S. M. Method of performing osmotic distillation. US 4,781,837, Nov. 1 1988, 1988.
152. Gostoli, C.; Bandini, S., Gas membrane extraction of ethanol by glycols : Experiments and modelling. *Journal of Membrane Science* **1995**, 98, 1-12.
153. Shaw, P. E.; Lebrun, M.; Dornier, M.; Ducamp, M. N.; Courel, M.; Reynes, M., Evaluation of Concentrated Orange and Passionfruit Juices Prepared by Osmotic Evaporation. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **2001**, 34, (2), 60-65.
154. Cassano, A.; Drioli, E.; Galaverna, G.; Marchelli, R.; Di Silvestro, G.; Cagnasso, P., *Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes*. *Journal of food engineering*. 2003 vol. 57 (2) : pp. 153 - 163 [11 p.]: 2003.
155. Cassano, A.; Figoli, A.; Tagarelli, A.; Sindona, G.; Drioli, E., Integrated membrane process for the production of highly nutritional kiwifruit juice. *Desalination* **2006**, 189, (1-3), 21-30.
156. Rodrigues, R. B.; Menezes, H. C.; Cabral, L. M. C.; Dornier, M.; Rios, G. M.; Reynes, M., Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu-camu juice (*Myrciaria dubia*). *Journal of food engineering* **2004**, 63, (1), 97-102.
157. Belafi-Bako, K.; Koroknai, B., Enhanced water flux in fruit juice concentration: Coupled operation of osmotic evaporation and membrane distillation. *Journal of Membrane Science* **2006**, 269, (1-2), 187-193.
158. Babu, B. R.; Rastogi, N. K.; Raghavarao, K., Mass transfer in osmotic membrane distillation of phycocyanin colorant and sweet-lime juice. *Journal of Membrane Science* **2006**, 272, (1-2), 58-69.
159. Durham, R. J.; Nguyen, M. H., Hydrophobic membrane evaluation and cleaning for osmotic distillation of tomato puree. *Journal of Membrane Science* **1994**, 87, (1-2), 181-189.

160. Dhuique-Mayer, C. Evaluation de la qualité nutritionnelle des jus d'agrumes : estimation in vitro de la biodisponibilité des caroténoïdes. Montpellier II, Montpellier, France, 2007.
161. George, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M. J., Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, (5), 1370-1373.
162. Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E., Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal AOAC Int.* **2005**, 88, 1269–1278.
163. Jiménez, N.; Bohuon, P.; Lima, J.; Dornier, M.; Vaillant, F.; Peñalver, A. M., Kinetics of Anthocyanin Degradation and Browning in Reconstituted Blackberry Juice Treated at High Temperatures (100–180 °C). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, (4), 2314-2322.
164. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L., Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, (10), 4619-4626.
165. Gancel, A.-L.; Alter, P.; Dhuique-Mayer, C.; Ruales, J.; Vaillant, F., Identifying Carotenoids and Phenolic Compounds In Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. Var. Puyo Hybrid), an Andean Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, (24), 11890-11899.
166. Vaillant, F. Clarification et concentration de jus de fruits tropicaux pulpeux associant traitements enzymatiques, microfiltration tangentielle et évaporation osmotique. ENSIA, Montpellier, France, 2000.
167. Christie, J. G., *Transport Processes and unite operations*. 3ème édition ed.; Prentice Hall, Inc: Englewood Cliffs, New Jersey, 1993.
168. Diop, N.; Ndiaye, A.; Cisse, M.; Dieme, O.; Dornier, M.; Sock, O., Le ditax (*Detarium senegalense* J. F. Gmel.) : principales caractéristiques et utilisations au Sénégal *Fruits* **2010**, 65, 293-360.
169. Besco, E.; Braccioli, E.; Vertuani, S.; Ziosi, P.; Brazzo, F.; Bruni, R.; Sacchetti, G.; Manfredini, S., The use of photochemiluminescence for the measurement of the integral antioxidant capacity of baobab products. *Food Chemistry* **2007**, 102, (4), 1352-1356.
170. Lam, H. S.; Proctor, A.; Howard, L.; Cho, M. J., Rapid Fruit Extracts Antioxidant Capacity Determination by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Food Science* **2005**, 70, (9), C545-C549.
171. Xu, B.; Yuan, S.; Chang, S., Comparative Analyses of Phenolic Composition, Antioxidant Capacity, and Color of Cool Season Legumes and Other Selected Food Legumes. *Journal of Food Science* **2007**, 72, (2), S167-S177.
172. Mazza, G., Health aspects of natural colors. In *Natural Food and Colorants Science and Technology*. In Francis, G.J.L.F.J. Ed.: Marcel Decker New York, 2000.
173. Mertz, C.; Cheynier, V.; Gunata, Z.; Brat, P., Analysis of Phenolic Compounds in Two Blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, (21), 8616-8624.
174. Prodanov, M. P.; Dominguez, J. A.; Blazquez, I.; Salinas, M. R.; Alonso, G. L., Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts. *Food Chemistry* **2005**, 90, (4), 585-596.

175. Reyes, L. F.; Cisneros-Zevallos, L., Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry* **2007**, 100, (3), 885-894.
176. Du, C. T.; Francis, F. J., Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of Food Science* **1973**, 38, 810-812.
177. Wong, P. K.; Yusof, S.; Ghazali, H.M.; Che-Man, Y. B., Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition & Food Science* **2002**, 32, 68-73.
178. Cisse, M.; Dornier, M.; Sakho, M.; Ndiaye, A.; Reynes, M.; Sock, O., Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations. *Fruits* **2009**, 64, (3), 179-193.
179. Cisse, M.; Dornier, M.; Sakho, M.; MarDiop, C.; Reynes, M.; Sock, O., La production du bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au Sénégal. *Fruits* **2009**, 64, (2), 111-124.
180. Buglione, M.; Lozano, J., Nonenzymatic Browning and Chemical Changes During Grape Juice Storage. *Journal of Food Science* **2002**, 67, (4), 1538-1543.
181. Chutintrasri, B.; Noomhorm, A., Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing. *LWT - Food Science and Technology* **2007**, 40, (2), 300-306.
182. Zozio, S.; Pallet, D.; Dornier, M., Evaluation of anthocyanin stability during storage of a coloured drink made from extracts of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and black carrot (*Daucus carota* L.). *Fruits* **2010**, sous presse.
183. Aurelio, D.-L.; Edgardo, R. G.; Navarro-Galindo, S., Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. *International Journal of Food Science & Technology* **2008**, 43, (2), 322-325.
184. Cisse, M.; Vaillant, F.; Acosta, O.; Dhuique-Mayer, C.; Dornier, M., Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57, (14), 6285-6291.
185. Gradinaru, G.; Biliaderis, C. G.; Kallithraka, S.; Kefalas, P.; Garcia-Viguera, C., Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry* **2003**, 83, (3), 423-436.
186. Dhuique-Mayer, C.; Tbatou, M.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dornier, M.; Amiot, M. J., Thermal Degradation of Antioxidant Micronutrients in Citrus Juice: Kinetics and Newly Formed Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, (10), 4209-4216.
187. Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. F., Compendium of methods for the microbiological examination of foods. *Washington, DC7 Public Health Association*. **1992**.
188. Tonon, R. V.; Brabet, C.; Hubinger, M. D., Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* **2010**, 43, (3), 907-914.
189. Wang, W.-D.; Xu, S.-Y., Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering* **2007**, 82, (3), 271-275.
190. Kirca, A.; Cemeroglu, B., Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chemistry* **2003**, 81, (4), 583-587.
191. Kirca, A.; Özkan, M.; Cemeroglu, B., Effects of temperature, solid content and pH on stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry* **2007**, 101, (1), 212-218.
192. Kirca, A.; Ozkan, M.; Cemeroglu, B., Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry* **2006**, 97, (4), 598-605.

193. Garzón, G. A.; Wrolstad, R. E., Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. *Journal of Food Science* **2002**, 67, (4), 1288-1299.
194. Kirca, A.; Özkan, M.; Cemeroglu, B., Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry* **2006**, 97, (4), 598-605.
195. Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M. J., Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, (1), 170-176.
196. Markakis, P., Anthocyanins and their stability in foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology* **1974**, 4, (4), 437-456.
197. Kirca, A.; Ozkan, M.; Cemeroglu, B., Thermal stability of black carrot anthocyanins in blond orange juice. *Journal of Food Quality* **2003**, 26, (5), 361-366.
198. Kirca, A.; Ozkan, M.; Cemeroglu, B., Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry* **2007**, 101, (1), 212-218.
199. Manso, M. C.; Oliveira, F. A. R.; Oliveira, J. C.; Frías, J. M., Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice under aerobic conditions. *International Journal of Food Science & Technology* **2001**, 36, (3), 303-312.
200. Rattanathanalerk, M.; Chiewchan, N.; Srichumpoung, W., Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice. *Journal of Food Engineering* **2005**, 66, (2), 259-265.
201. Vaikousi, H.; Koutsoumanis, K.; Biliaderis, C. G., Kinetic modelling of non-enzymatic browning of apple juice concentrates differing in water activity under isothermal and dynamic heating conditions. *Food Chemistry* **2008**, 107, (2), 785-796.
202. Selen Burdurlu, H.; Karadeniz, F., Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates. *Food Chemistry* **2003**, 80, (1), 91-97.
203. Timberlake, C. F.; Bridle, P., Spectral studies of anthocyanin and anthocyanidin equilibria in aqueous solution. *Nature* **1966**, 212, 158-165.
204. Mazza, G.; Miniati, E., *Anthocyanin in fruits. Vegetables and Grains*. Boca Raton, FL ed.; CRC Press: 1993.
205. Juliani, H. R.; Welch, C. R.; Wu, Q.; Diouf, B.; Malainy, D.; Simon, J. E., Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. *Journal of Food Science* **2009**, 74, (2), S113-S121.
206. Mantell, C.; Rodriguez, M.; de la Ossa, E. M., Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modelling. *Chemical Engineering Science* **2002**, 57, (18), 3831-3838.
207. Mantell, C.; Rodriguez, M.; de la Ossa, E. M., Estimation of the diffusion coefficient of a model food dye (malvidin 3,5-diglucoside) in a high pressure CO₂ plus methanol system. *Journal of Supercritical Fluids* **2004**, 29, (1-2), 165-173.
208. Tsai, P. J.; McIntosh, J.; Pearce, P.; Camden, B.; Jordan, B. R., Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* **2002**, 35, (4), 351-356.
209. Chalermchat, Y.; Fincan, M.; Dejmek, P., Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment: mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering* **2004**, 64, (2), 229-236.
210. Fincan, M.; DeVito, F.; Dejmek, P., Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering* **2004**, 64, (3), 381-388.

211. Ben Amor, B.; Allaf, K., Impact of texturing using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Food Chemistry* **2009**, 115, (3), 820-825.
212. Wongkittipong, R.; Prat, L.; Damronglerd, S.; Gourdon, C., Solid-liquid extraction of andrographolide from plants--experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology* **2004**, 40, (2), 147-154.
213. Li, J. C. M.; Change, P., Self-diffusion coefficient and viscosity in liquids. *Chem.Phys.* **1955**, 23, 518.
214. Chang, Y.-C.; Huang, H.-P.; Hsu, J.-D.; Yang, S.-F.; Wang, C.-J., Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2005**, 205, (3), 201-212.
215. Chang, Y.-C.; Huang, K.-X.; Huang, A.-C.; Ho, Y.-C.; Wang, C.-J., Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food and Chemical Toxicology* **2006**, 44, (7), 1015-1023.
216. Chen, C.-C.; Hsu, J.-D.; Wang, S.-F.; Chiang, H.-C.; Yang, M.-Y.; Kao, E.-S.; Ho, Y.-C.; Wang, C.-J., *Hibiscus sabdariffa* Extract Inhibits the Development of Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, (18), 5472-5477.
217. Wrolstad, R. E., Symposium 12: Interaction of natural colors with other ingredients - Anthocyanin pigments - Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science* **2004**, 69, (5), C419-C421.
218. Wrolstad, R. E., Anthocyanin Pigments—Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science* **2004**, 69, (5), C419-C425.
219. Lee, W.-C.; Wang, C.-J.; Chen, Y.-H.; Hsu, J.-D.; Cheng, S.-Y.; Chen, H.-C.; Lee, H.-J., Polyphenol Extracts from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Attenuate Nephropathy in Experimental Type 1 Diabetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57, (6), 2206-2210.
220. Lin, H.-H.; Chen, J.-H.; Kuo, W.-H.; Wang, C.-J., Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chemico-Biological Interactions* **2007**, 165, (1), 59-75.
221. Lin, T.-L.; Lin, H.-H.; Chen, C.-C.; Lin, M.-C.; Chou, M.-C.; Wang, C.-J., *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research* **2007**, 27, (3), 140-145.
222. Liu, J.-Y.; Chen, C.-C.; Wang, W.-H.; Hsu, J.-D.; Yang, M.-Y.; Wang, C.-J., The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl4-induced liver fibrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology* **2006**, 44, (3), 336-343.
223. Dyrby, M.; Westergaard, N.; Stapelfeldt, H., Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry* **2001**, 72, (4), 431-437.
224. Francis, F. J., Anthocyanins and betalains: Composition and applications. *Cereal Foods World* **2000**, 45, (5), 208-213.
225. Mazza, G.; Brouillard, R., Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food-products. *Food Chemistry* **1987**, 25, (3), 207-225.
226. Starr, M. S., The effect of some metal ions on the colour and stability of the anthocyanin pigments of cranberry cocktail. *1143bc* **1972**, 33, (1), 33 (1) 260: Order no. 72-19 487.
227. Tiwari, B. K.; O'Donnell, C. P.; Patras, A.; Cullen, P. J., Anthocyanin and Ascorbic Acid Degradation in Sonicated Strawberry Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, (21), 10071-10077.

228. Koca, I.; Ustun, N. S., Colour Stability in Sour Cherry Jam During Storage. *Asian Journal of Chemistry* **2009**, 21, (2), 1011-1016.
229. Campos, D. C. P.; Santos, A. S.; Wolkoff, D. B.; Matta, V. M.; Cabral, L. M. C.; Couri, S., Cashew apple juice stabilization by microfiltration. *Desalination* **2002**, 148, (1-3), 61-65.
230. Carneiro, L.; Sa, I. D.; Gomes, F. D.; Matta, V. M.; Cabral, L. M. C., Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. *Desalination* **2002**, 148, (1-3), 93-98.
231. AOAC., Fruits and fruits products. In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International*; Helrich K., Ed.; Arlington, VA 1990; pp 910-928.
232. Castaing, J. B.; Massé, A.; Pontié, M.; Séchet, V.; Haure, J.; Jaouen, P., Investigating submerged ultrafiltration (UF) and microfiltration (MF) membranes for seawater pre-treatment dedicated to total removal of undesirable micro-algae. *Desalination* **2010**, 253, (1-3), 71-77.
233. Ebrahimi, M.; Willershausen, D.; Ashaghi, K. S.; Engel, L.; Placido, L.; Mund, P.; Bolduan, P.; Czermak, P., Investigations on the use of different ceramic membranes for efficient oil-field produced water treatment. *Desalination* **2010** 250, (3), 991-996.
234. Ushikubo, F. Y.; Watanabe, A. P.; Viotto, L. A., Effects of operating conditions and enzyme treatment on fouling and polarized layer formation during umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) juice microfiltration. *Desalination* **2006**, 200, (1-3), 546-548.
235. Buethorn, S.; Carstensen, F.; Wintgens, T.; Melin, T.; Volmering, D.; Vossenkaul, K., Permeate flux decline in cross-flow microfiltration at constant pressure. *Desalination* **2010**, 250, (3), 985-990.
236. Mirsaedghazi, H.; Emam-Djomeh, Z.; Mousavi, S. M.; Aroujalian, A.; Navidbakhsh, M., Clarification of pomegranate juice by microfiltration with PVDF membranes. *Desalination* **2010**, In Press, Corrected Proof.
237. Yao, M.; Zhang, K.; Cui, L., Characterization of protein-polysaccharide ratios on membrane fouling. *Desalination* **2010**, 259, (1-3), 11-16.
238. Martzel, B.; Jouenne, E., Colouring foods with anthocyanin. *Asia Pacific Food Industry* **2009**, March, 50-52.
239. Clifford, M. N., Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, 80, (7), 1063-1072.
240. Pliszka, B.; Huszcza-Ciolkowska, G.; Miesleszko, E.; Czaplicki, S., Stability and antioxidative properties of acylated anthocyanins in three cultivars of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L. f. rubra). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2009**, 89, (7), 1154-1158.
241. Sun, J.; Yao, J. Y.; Huang, S. X.; Long, X.; Wang, J. B.; Garcia-Garcia, E., Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) AC Smith. *Food Chemistry* **2009**, 117, (2), 276-281.
242. Stintzing, F. C.; Carle, R., Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* **2004**, 15, (1), 19-38.
243. Aurelio, D.-L.; Edgardo, R. G.; Navarro-Galindo, S., Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. *International Journal of Food Science & Technology* **2008**, 43, (2), 322-325.
244. Juliani, H. R.; Welch, C. R.; Wu, Q.; Diouf, B.; Malainy, D.; Simon, J. E., Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. *Journal of Food Science* **2009**, 74, (2), S113-S121.

245. Tsui, E. M.; Cheryan, M., Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn. *Journal of Food Engineering* **2007**, 83, (4), 590-595.
246. Butylina, S.; Luque, S.; Nyström, M., Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science* **2006**, 280, (1-2), 418-426.
247. Catarino, I.; Minhalma, M.; Beal, L. L.; Mateus, M.; de Pinho, M. N., Assessment of saccharide fractionation by ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science* **2008**, 312, (1-2), 34-40.
248. Bessarabov, D.; Twardowski, Z., Industrial application of nanofiltration -- new perspectives. *Membrane Technology* **2002**, 2002, (9), 6-9.
249. Díaz-Reinoso, B.; González-López, N.; Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Recovery of antioxidants from industrial waste liquors using membranes and polymeric resins. *Journal of Food Engineering* **2010**, 96, (1), 127-133.
250. Iaquinta, M.; Stoller, M.; Merli, C., Optimization of a nanofiltration membrane process for tomato industry wastewater effluent treatment. *Desalination* **2009**, 245, (1-3), 314-320.
251. Atrá, R.; Vatai, G.; Bekassy-Molnar, E.; Balint, A., Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering* **2005**, 67, (3), 325-332.
252. Fernández, P.; Riera, F. A.; Álvarez, R.; Álvarez, S., Nanofiltration regeneration of contaminated single-phase detergents used in the dairy industry. *Journal of Food Engineering* **2010**, 97, (3), 319-328.
253. Kemal Erdem, Y., Effect of ultrafiltration, fat reduction and salting on textural properties of white brined cheese. *Journal of Food Engineering* **2005**, 71, (4), 366-372.
254. Cassano, A.; Conidi, C.; Timpone, R.; D'Avella, M.; Drioli, E., A membrane-based process for the clarification and the concentration of the cactus pear juice. *Journal of Food Engineering* **2007**, 80, (3), 914-921.
255. Cassano, A.; Donato, L.; Drioli, E., Ultrafiltration of kiwifruit juice: Operating parameters, juice quality and membrane fouling. *Journal of Food Engineering* **2007**, 79, (2), 613-621.
256. Díaz-Reinoso, B.; Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. *Journal of Food Engineering* **2009**, 91, (4), 587-593.
257. Banvolgyi, S.; Kiss, I.; Bekassy-Molnar, E.; Vatai, G., Concentration of red wine by nanofiltration. *Desalination* **2006**, 198, (1-3), 8-15.
258. Warczok, J.; Ferrando, M.; Lopez, F.; Guell, C., Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. *Journal of Food Engineering* **2004**, 63, (1), 63-70.
259. Deen, W. M., Hindered transport of large molecules in liquid-filled pores. *AIChE Journal* **1987**, 33, (9), 1409-1425.
260. Koyuncu, I.; Topacik, D., Effect of organic ion on the separation of salts by nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science* **2002**, 195, (2), 247-263.
261. Spiegler, K. S.; Kedem, O., Thermodynamics of hyperfiltration (reverse osmosis): criteria for efficient membranes. *Desalination* **1966**, 1, (4), 311-326.
262. Kalhoinen, M.; Pekkarinen, M.; Manttari, M.; Nuortila-Jokinen, J.; Nystrom, M., Comparison of the performance of two different regenerated cellulose ultrafiltration membranes at high filtration pressure. *Journal of Membrane Science* **2007**, 294, (1-2), 93-102.

263. Bohonak, D. M.; Zydney, A. L., Compaction and permeability effects with virus filtration membranes. *Journal of Membrane Science* **2005**, 254, (1-2), 71-79.
264. Bernat, X.; Pihlajamäki, A.; Fortuny, A.; Bengoa, C.; Stüber, F.; Fabregat, A.; Nyström, M.; Font, J., Non-enhanced ultrafiltration of iron(III) with commercial ceramic membranes. *Journal of Membrane Science* **2009**, 334, (1-2), 129-137.
265. Huisman, I. H.; Dutré, B.; Persson, K. M.; Trägårdh, G., Water permeability in ultrafiltration and microfiltration: Viscous and electroviscous effects. *Desalination* **1997**, 113, (1), 95-103.
266. Persson, K. M.; Gekas, V.; Trägårdh, G., Study of membrane compaction and its influence on ultrafiltration water permeability. *Journal of Membrane Science* **1995**, 100, (2), 155-162.
267. Van der Bruggen, B.; Everaert, K.; Wilms, D.; Vandecasteele, C., Application of nanofiltration for removal of pesticides, nitrate and hardness from ground water: rejection properties and economic evaluation. *Journal of Membrane Science* **2001**, 193, (2), 239-248.
268. Ding, Z.; Liu, L.; Yu, J.; Ma, R.; Yang, Z., Concentrating the extract of traditional Chinese medicine by direct contact membrane distillation. *Journal of Membrane Science* **2008**, 310, (1-2), 539-549.
269. Banvolgyi, S.; Horvath, S.; Stefanovits-Banyai, E.; Bekassy-Molnar, E.; Vatai, G., Integrated membrane process for blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) juice concentration. Third Membrane Science and Technology Conference of Visegrad Countries (PERMEA) (Volume 241). **2009**.
270. Jiao, B.; Cassano, A.; Drioli, E., Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: a review. *Journal of food engineering* **2004**, 63, (3), 303-324.
271. Hirunpanich, V.; Utaipat, A.; Morales, N. P.; Bunyapraphatsara, N.; Sato, H.; Herunsale, A.; Suthisisang, C., Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, 103, (2), 252-260.
272. Odigie, I. P.; Ettarh, R. R.; Adigun, S. A., Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2003**, 86, (2-3), 181-185.
273. Shaw, P. E.; Lebrun, M.; Dornier, M.; Ducamp, M. N.; Courel, M.; Reynes, M., Evaluation of concentrated orange and passionfruit juices prepared by osmotic evaporation. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* **2001**, 34, (2), 60-65.
274. Drosos, J. C.; Viola-Rhenals, M.; Vivas-Reyes, R., Quantitative structure-retention relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons gas-chromatographic retention indices. *Journal of Chromatography A* 1217, (26), 4411-4421.
275. Courel, M.; Dornier, M.; Herry, J.-M.; Rios, G. M.; Reynes, M., Effect of operating conditions on water transport during the concentration of sucrose solutions by osmotic distillation. *Journal of Membrane Science* **2000**, 170, (2), 281-289.
276. Ali, F.; Dornier, M.; Duquenoy, A.; Reynes, M., Evaluating transfers of aroma compounds during the concentration of sucrose solutions by osmotic distillation in a batch-type pilot plant. *Journal of food engineering* **2003**, 60, (1), 1-8.
277. Courel, M.; Dornier, M.; Rios, G. M.; Reynes, M., Modelling of water transport in osmotic distillation using asymmetric membrane. *Journal of Membrane Science* **2000**, 173, (1), 107-122.

RÉSUMÉ

Hibiscus sabdariffa L. est une plante vivace herbacée localisée dans les zones tropicales et subtropicales des deux hémisphères. Au Sénégal, où elle a été introduite au 19^{ème} siècle, *H. sabdariffa*, encore appelé bissap ou roselle, est cultivé sur l'ensemble du territoire et exploité principalement pour ses calices. Une boisson désaltérante est traditionnellement élaborée à partir des calices séchés par extraction à l'eau. La caractérisation physico-chimique et biochimique des calices nous a tout d'abord permis de mieux évaluer le potentiel de ce produit. Ainsi, les calices contiennent entre 767 et 1480 mg.100g⁻¹ d'anthocyanes et entre 1347 et 3736 mg.100g⁻¹ de polyphénols totaux. Ils présentent un pouvoir antioxydant voisin de 260 µmolTrolox.g⁻¹. L'acide malique y est l'acide organique majoritaire avec une teneur pouvant atteindre 2,3 g.100g⁻¹. De part ces caractéristiques, l'extrait aqueux de calices d'*H. sabdariffa* constitue une excellente source d'anthocyanes. Le travail s'est ensuite focalisé sur le procédé d'obtention de cet extrait. L'étude de l'extraction solide-liquide a été réalisée à partir de calices séchés et d'eau à des températures comprises entre 25 et 90 °C. Un rendement d'extraction en anthocyanes maximum de 88 % a été obtenu à 25 °C avec un ratio calice/eau de 1/25. La réduction de la taille des particules et l'augmentation de la température diminuent le temps d'extraction mais n'affectent pas le rendement d'extraction. Un modèle d'extraction solide-liquide incluant les cinétiques de dégradation thermique des anthocyanes a été proposé puis validé. La microfiltration tangentielle sur membrane céramique de diamètre moyen de pores 0,2 µm a permis de produire un extrait stérilisé à froid, stable pendant 90 j à 20 °C. Nous avons montré à ce niveau que la pression transmembranaire optimisée à un facteur de réduction volumique (FRV) égal à 1 n'est plus optimale lorsque le FRV augmente. Pour concentrer les anthocyanes présents dans l'extrait, l'ultrafiltration sur une membrane de seuil de coupure de 5 kDa peut être utilisée malgré une rétention incomplète (95-97 %). Par contre, la nanofiltration offre une rétention totale des anthocyanes. Le procédé, mis en œuvre dans des conditions semi-industrielles, a permis d'augmenter la teneur en extrait sec soluble (ESS) de 40 à 250 g.kg⁻¹ à 35 °C, à une pression transmembranaire comprise entre 20 et 30 bar avec un flux moyen de 15 kg.h⁻¹.m⁻². L'évaporation osmotique, testée sur un pilote équipé d'une membrane en polypropylène de 10 m², a permis de concentrer l'extrait anthocyanique jusqu'à 620 g d'ESS.kg⁻¹. Cet extrait concentré conserve toutes les qualités physico-chimiques, biochimiques, nutritionnelles et aromatiques de l'extrait initial. Le flux évaporatoire est directement corrélé à la teneur en extrait sec soluble du produit à concentrer. Enfin, divers couplages d'opérations unitaires ont été comparés pour obtenir un extrait concentré à partir de calices d'*H. sabdariffa*. Le procédé qui associe une extraction à froid, une pré-concentration par nanofiltration et une concentration par évaporation osmotique est la meilleure voie tant en terme de coûts d'investissement et de fonctionnement que de qualité de l'extrait.

Mots clés : *Hibiscus sabdariffa*, extraction solide-liquide, microfiltration tangentielle, ultrafiltration, nanofiltration, évaporation osmotique, qualité, couplage.